

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 31 janvier 2001 (31.01.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/01744	Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST99021
Date du dépôt international (jour/mois/année) 22 juin 2000 (22.06.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 22 juin 1999 (22.06.99)
Déposant DARTEIL, Raphaël etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

29 décembre 2000 (29.12.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colmbettes
1211 Gèneve 20, Suisse

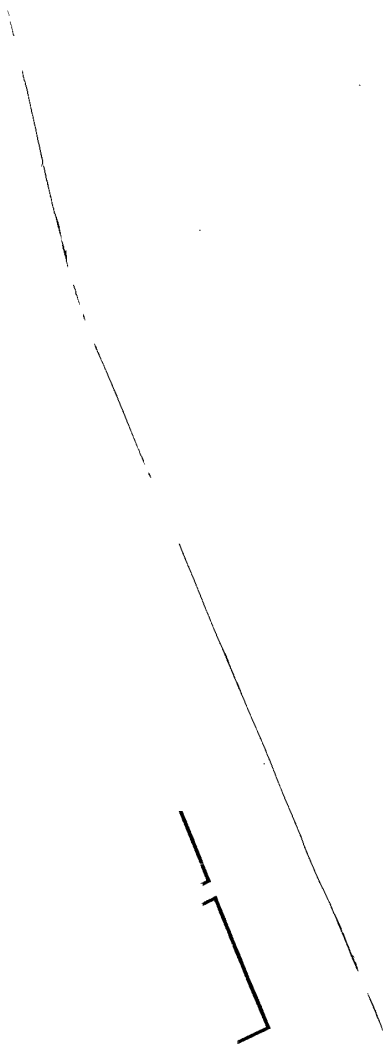
Fonctionnaire autorisé

Antonia Muller

no de télécopieur: (41-22) 740.14.35

no de téléphone: (41-22) 338 83 38

Formulaire PCT/IB/331 (juillet 1992)



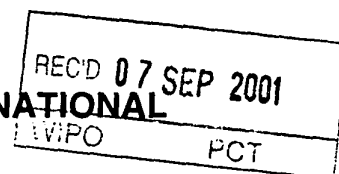
T 15

TRAITE DE OPERATION EN MATIERE BREVETS

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)





Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST99021	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/01744	Date du dépôt international (jour/mois/année) 22/06/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 22/06/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/85		
Déposant AVENTIS PHARMA S.A. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 11 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
- ☐ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).
- Ces annexes comprennent feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☒ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 29/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 03.09.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Seroz, T N° de téléphone +49 89 2399 7789 

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01744

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-43 version initiale

Revendications, N°:

1-33 reçue(s) le 29/12/2000 avec la lettre du 27/12/2000

Dessins, feuilles:

1/27-27/27 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-9, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/01744

- ☒ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n°s :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

II. Priorité

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :
- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
2. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :
voir feuille séparée

III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :
- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 28, 33 voir citations et explications.

parce que :

RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/01744

- ☒ la demande internationale, ou les revendications n°s 28, 33 en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue d'effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :
voir feuille séparée
- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n°s en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☐ les revendications, ou les revendications n°s en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n°s en question.
2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif:
- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- ☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui :	Revendications	4, 6, 16, 18-22, 27, 30-31
	Non :	Revendications	1-3, 5, 7-15, 17, 23-26, 28-29, 32-33
Activité inventive	Oui :	Revendications	16, 30-31
	Non :	Revendications	1-15, 17-29, 32-33
Possibilité d'application industrielle	Oui :	Revendications	1-27, 29-32
	Non :	Revendications	

2. Citations et explications **voir feuille séparée**

VIII. Observations relatives à la demande internationale

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :
voir feuille séparée



Remarques complémentaires concernant le point I

Ce rapport d'examen préliminaire international a été établi sur la base des documents de la présente demande ainsi que des séquences SEQ ID No 1 à SEQ ID No 28, pages 1-9.

Remarques complémentaires concernant le point II

Le document de priorité relatif à la présente demande a été consulté. Il apparaît que la totalité des revendications jouissent du droit de priorité à compté de la date d'enregistrement du document de priorité (22.06.99).

Remarques concernant le point III

Les revendications 28 et 33, dans la mesure où elles concernent l'utilisation in vivo d'un composé à des fins thérapeutiques ou diagnostiques, se rapportent à un objet considéré par cette Autorité comme entrant dans le champ de la Règle 67.1 PCT. En conséquence, aucune opinion ne sera formulée quant à l'application industrielle de l'objet de ces revendications (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Remarques complémentaires concernant le point V

La présente demande se rapporte à une composition comprenant deux éléments, l'un contenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible constitué entre autres d'un élément de réponse à un PPAR (SEQ ID No 1, 5) et d'un promoteur transcriptionnel minimal, l'autre comprenant la séquence codante d'un PPAR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel, ces deux éléments pouvant être utilisés de façon simultanée ou espacée dans le temps. Cette invention peut permettre la régulation efficace de l'expression d'acides nucléiques in vivo à des fins cliniques, thérapeutiques ou diagnostiques. Les exemples décrivent entre autres la construction de différents plasmides d'expression contenant des promoteurs inductibles par les PPAR, ces promoteurs pouvant contenir plusieurs éléments de réponse aux PPAR, la construction de plasmides contenant un gène codant pour un PPAR modifié de telle sorte qu'il possède plusieurs sites de liaison du ligand, ainsi que des plasmides comprenant à la fois une cassette d'expression du régulateur transcriptionnel (PPAR) et une cassette d'expression inductible.

Le présent rapport d'examen préliminaire international fait mention des documents (D) suivants qui ont été cités dans le Rapport International Préliminaire de Recherche

comme étant d'un intérêt particulier pour l'évaluation de la nouveauté et de l'activité inventive de l'objet des revendications. Le numéro d'ordre qui leur est attribué ci-après sera utilisé dans toute la suite de la procédure:

D1: BARDOT, O. ET AL.: 'PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme' BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 192, no. 1, 1993, pages 37-45, XP000907578 ORLANDO, FL US

D2: WO 96 01317 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 18 janvier 1996 (1996-01-18)

Les autres documents classés X dans le Rapport International de Recherche ont également été considérés comme étant susceptibles d'anticiper la nouveauté et pour évaluer l'activité inventive de la présente demande puisque leur contribution est similaire à celle des documents D1 et D2.

Nouveauté Article 33(2) PCT

Le Document D1 concerne la mise en évidence d'une séquence de réponse au PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) en amont du gène de l'enzyme péroxisomal bifonctionnel. Il est montré que le PPAR α et le RXR α (récepteur X aux acides rétinoïques) forment un hétérodimère capable de se lier spécifiquement à cette séquence, démontrant ainsi le rôle important joué par le PPAR α dans la médiation de l'action des proliférateurs de péroxisomes.

Le document D2 décrit la co-transfection de cellules CV-1 avec un vecteur d'expression d'un PPAR et un vecteur d'expression d'un gène rapporteur comprenant trois copies de l'élément de réponse à un PPAR en amont du promoteur de la thymidine kinase, ce promoteur gouvernant l'expression du gène de la luciférase en réponse au ligand de PPAR, Wy 14.643. Ce document concerne également les diverses utilisations de cette invention en particulier une méthode pour l'expression de PPAR recombinants ainsi qu'une méthode de criblage de ligands de PPAR. Ces ligands peuvent être utilisés comme régulateur du métabolisme des lipides.

L'Autorité d'Examen International Préliminaire (AEIP) est d'avis qu'en raison d'un

manque de clarté (voir les remarques complémentaires concernant le point VIII), les revendications 1-3, 5, 7-14, 15, 17, 23-26, 28-29, 32-33 présentent un défaut de nouveauté (Article 33(2) PCT).

(i). Ainsi, le document D1 décrit la construction de deux vecteurs plasmidiques, l'un comprenant le gène codant pour la luciférase en amont duquel se trouve le promoteur de la beta-globine ainsi qu'un élément de réponse au PPAR α constitué de 3 sites de liaison du PPAR α (TGACCT, un "variant fonctionnel" des séquences SEQ ID No 1 et 5), l'autre vecteur comprenant le gène codant pour le PPAR α . Un troisième vecteur comprenant le gène codant pour le RXR α est également décrit. Ces vecteurs sont utilisés dans des expériences de co-transfections de cellules hépatiques de souris pour étudier le rôle du PPAR α dans la régulation de l'expression du gène codant pour la luciférase en présence ou en absence de Wy-14,643, un ligand de PPAR α (page 38, "plasmid constructions" et "transfection assays"; page 39, "results" lignes 7-10; figure 1, 4; page 44 "discussion" lignes 3-10).

Ainsi, le document D1 anticipe la nouveauté des revendications 1-3, 5, 7-14, 15, 17, 23-26, 28-29.

Le document D2 présentant le même "variant fonctionnel" de PPRE (TGACCT) que le document D1, est également susceptible d'anticiper la nouveauté de ces mêmes revendications

(ii). Les revendications 32 et 33 concernent un procédé d'identification de ligands des PPAR comprenant la mise en contact d'une cellule modifiée par la composition ou le vecteur revendiqué ainsi qu'une molécule test et la mise en évidence de l'expression d'un gène d'intérêt.

Le document D2 présente une méthode de criblage d'agonistes pour les récepteurs PPAR γ et δ , cette méthode comprenant une étape de mise en contact d'une cellule avec la molécule test, cette cellule exprimant l'un desdits récepteurs ainsi qu'un gène rapporteur dont la séquence codante est reliée à un élément de réponse à un PPAR. Cette méthode comprend en outre, la mesure du niveau d'expression du gène rapporteur, cette expression reflétant l'activité transcriptionnelle du PPAR et par conséquent la présence d'un complexe récepteur-ligand actif (page 28, lignes 4-9 et page 34-35, revendication 14).

Le document D2 anticipe, par conséquent, la nouveauté des revendications 32 et 33. De même, la nouveauté de l'objet de ces revendications ne pourrait pas être reconnu

eu égard à la description de procédés similaires dans plusieurs des autres documents cités dans le Rapport International de Recherche.

(iii). Aucun des documents de l'art antérieur cités dans le rapport préliminaire de recherche ne décrit ou ne suggère la composition, le vecteur, le procédé, le polypeptide et l'acide nucléique dont font l'objet respectivement les revendications 4, 6, 16, 18-22 30 et 31 qui satisfont par conséquent aux conditions de nouveauté de l'Article 33(2) du PCT.

Activité inventive (Article 33(3) PCT)

A la lecture de l'art antérieur concernant les PPAR, il est sembler que quand bien même le Demandeur limiterait l'objet revendiqué aux seules séquences SEQ ID No 1 et 5, celui-ci ne satisferait pas aux conditions de l'Article 33(3) PCT. En effet, les différents PPARs reconnaissent divers éléments de réponse aux PPARs. Le choix des séquences SEQ ID No 1 et 5 semble purement arbitraire et ne contribue pas à un/des effet(s) technique(s) ou avantage(s) particulier(s). De plus, la séquence SEQ ID No 5 comprend la séquence complémentaire de l'élément de réponse à un PPAR des documents D1 et D2 (TGACCT), ce qui entraînerait également une absence d'activité inventive pour les revendications précitées.

(i). La revendication 6 concerne l'emploi d'un virus adéno-associé en tant que vecteur pour la construction génétique revendiquée. L'utilisation d'un tel vecteur est purement arbitraire eu égard au fait que celui-ci ne confère aucun effet technique particulier pouvant être considéré comme une contribution positive à l'activité inventive. En conséquence, la revendication 6 ne satisfait pas aux conditions de l'Article 33(3) PCT.

(ii). L'insertion de deux (ou davantage) cassettes d'expression dans un seul vecteur est une des nombreuses alternatives connues de l'homme du métier pour co-exprimer différents gènes. De plus, l'assemblage de deux cassettes d'expression en orientation opposée pour former un "promoteur bidirectionnel régulable" est une pratique connue dans le domaine technique correspondant et n'apporte par conséquent, aucune contribution à l'activité inventive. Ainsi, les revendications 4, 18-22 ne sont pas inventives.

(iii). La revendication 27 se rapporte au procédé revendiqué permettant l'expression

régulée d'un acide nucléique dans une cellule musculaire. Le choix du type cellulaire employé est arbitraire et ne témoigne pas d'une activité inventive particulière, et ce d'autant plus qu'il est le seul type cellulaire à avoir été utilisé avec les constructions génétiques revendiquées. La revendication 27 n'est, par conséquent, pas inventive.

Aucun des documents de l'art antérieur cités dans le rapport préliminaire de recherche ne décrit ou ne suggère la composition, le polypeptide et l'acide nucléique dont font l'objet respectivement les revendications 16, 30 et 31 qui satisfont par conséquent aux conditions d'inventivité de l'Article 33(3) du PCT.

Application Industrielle (Article 33(4) PCT)

L'attention du Demandeur est attirée sur le fait qu'il n'existe pas de critère unifié dans les Etats parties au PCT pour déterminer si les revendications 28 et 33 sont susceptibles d'application industrielle. La brevetabilité peut aussi dépendre de la manière dont les revendications ont été formulées. Ainsi, l'Office Européen des Brevets ne considère pas comme susceptible d'application industrielle l'objet de revendications d'utilisation in vivo d'un composé à des fins thérapeutiques ou diagnostiques.

En revanche, les revendications 1-27 et 29-32 satisfaisant aux conditions de l'Article 33(4) du PCT sont susceptibles d'application industrielle.

Remarques complémentaires concernant le point VIII

Les objections suivantes sont émises en vertu de l'Article 6 PCT en combinaison avec la Règle 6.3 PCT concernant la clarté des revendications:

(i). L'objet d'une revendication doit être clair par la seule rédaction de cette revendication et doit définir l'objet pour lequel la protection est recherchée par des caractéristiques techniques (voir Directives pour l'Examen Préliminaire International du PCT, III-4.2).

L'AEIP est d'avis que les termes "un acide nucléique", "élément" et "variants fonctionnels" sont vagues et équivoques.

De même, la caractérisation d'un produit simplement par son nom (tel que PPAR, PPAR modifié ou RXR) ou par sa fonction (telle que promoteur, promoteur inductible, promoteur bidirectionnel régulable, élément de réponse, site de liaison, région non essentielle, région amplificatrice, ligand de PPAR) sans réelle signification technique ne

satisfait pas aux exigences de l'Article 6 PCT en combinaison avec la Règle 6.3 PCT. En outre, les éléments de réponse, les promoteurs, les sites de liaisons, les ligands etc... étant des molécules chimiques, elles doivent être caractérisées clairement et de façon non ambiguë par leur séquence de nucléotides/leur structure chimique c'est à dire en faisant référence à leur SEQ ID No spécifique et/ou à un numéro de figure. Il est par conséquent nécessaire de reformuler les revendications 1-4, 7-22, 30-33 pour exposer l'invention à l'aide de caractéristiques techniques et ainsi éliminer toute incertitude.

(II). Il est difficile de concevoir une utilisation "séparée" et non "espacée dans le temps" de deux "éléments" appartenant à une même composition. Les revendications 1 et 2 présentent donc un défaut de clarté.

(iii). La revendication 5 mentionne l'utilisation de "la construction génétique" selon la revendication 3 qui elle décrit l'emploi de "constructions génétiques distinctes". Le contenu de la revendication 5 n'est par conséquent pas cohérent avec la revendication 3.

(iv). L'expression "variants fonctionnels" dans les revendications 8 et 9 implique que toute séquence possédant au moins un nucléotide des séquences SEQ ID No 1 et 5 et pour laquelle un PPAR présente une affinité remplit les conditions des revendications 8 et 9. De plus, une telle expression implique que la séquence SEQ ID No 1 est un "variant fonctionnel" de la séquence SEQ ID No 5 (et vice versa).

(v). Le terme "déléte" dans la revendication 11 ne donne aucune précision quant à l'étendue de la délétion en question. Ainsi, la délétion de région(s) non essentielle(s) à la transcription peut être interprétée comme la délétion d'un nucléotide dès lors que celle-ci n'affecte pas l'activité transcriptionnelle.

(vi). Les revendications 1 et 21 ne définissent pas clairement l'objet de la protection demandée (Article 6 PCT en combinaison avec la Règle 6.3(a) PCT). En effet, celles-ci ne mentionnent pas l'orientation des "éléments de réponse à un PPAR" de telle sorte qu'il est impossible de savoir quel gène verra son expression principalement régulée par le biais de ces "éléments de réponse à un PPAR" au sein d'un vecteur comprenant un "promoteur bidirectionnel régulable".

(vii). L'expression "cellule modifiée" dans la revendication 29 ne donne aucune information quant au type de modification que la cellule a subie en terme de caractéristiques techniques. Une revendication de produit dans laquelle le produit est défini par son procédé de fabrication n'est acceptable que si le produit en tant que tel est nouveau et implique une activité inventive, ce qui n'est pas le cas de l'objet de la revendication 29.

De plus, la seule mise en contact d'une cellule avec un vecteur (même viral) ne suffit pas à ladite cellule pour être modifiée. L'objet de la revendication 29 est insuffisamment décrit.

(viii). Le terme "produit" dans la revendication 24 est très vague. Il est impossible de déterminer la nature du "produit" en question à la lecture de la revendication.

(ix). L'exposé de la revendication 33 ne précise pas à quoi/qui la composition ou le vecteur revendiqué est administré pour identifier des ligands de PPAR. Une bactérie? Une levure? une plante? Une souris?



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

67

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10/018729

Applicant's or agent's file reference ST99021	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/01744	International filing date (day/month/year) 22 June 2000 (22.06.00)	Priority date (day/month/year) 22 June 1999 (22.06.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/85		
Applicant AVENTIS PHARMA S.A.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>11</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 December 2000 (29.12.00)	Date of completion of this report 03 September 2001 (03.09.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01744

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 1-43, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1-33, filed with the letter of 29 December 2000 (29.12.2000)
- ☒ the drawings:
pages 1/27-27/27, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages 1-9, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/01744

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

The present international preliminary examination report is based on the documents of the present application as well as sequences SEQ ID NO 1 to SEQ ID NO 28 (pages 1-9).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

national application No.

PCT/FR00/01744

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
 - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.
2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

SEE SEPARATE SHEET

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01744

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.

The priority document relevant to the present application has been checked. It appears that the claims in their entirety benefit from a right of priority as of the registration date of the priority document (22 June 1999).

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/01744

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 28,33

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28,33 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

SEE SEPARATE SHEET

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

The present Authority considers that the subject matter of claims 28 and 33 is covered by the provisions of PCT Rule 67.1 in so far as it relates to the in vivo use of a compound for therapeutic or diagnostic purposes. For this reason, no opinion will be given on the question of whether the subject matter of these claims is industrially applicable (PCT Article 34(4)(a)(i)).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/01744

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	4, 6, 16, 18-22, 27, 30, 31	YES
	Claims	1-3, 5, 7-15, 17, 23-26, 28, 29, 32, 33	NO
Inventive step (IS)	Claims	16, 30, 31	YES
	Claims	1-15, 17-29, 32, 33	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-27, 29-32	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The present application relates to a composition including two elements of which one contains a nucleic acid of interest under the control of an inducible promoter consisting, *inter alia*, of a PPAR response element (SEQ ID NO 1, 5) and a minimum transcriptional promoter, while the other includes the coding sequence of a PPAR under the control of a transcriptional promoter. Said elements can be used simultaneously or at different times. The present invention can enable effective regulation of *in vivo* nucleic acid expression for clinical, therapeutic or diagnostic purposes. The examples describe, *inter alia*, the construction of various expression plasmids containing PPAR-inducible promoters that optionally contain a plurality of PPAR response elements, the construction of plasmids containing a gene coding for a PPAR modified in such a way that it has a plurality of ligand binding sites, as well as plasmids including both an expression cassette of the transcriptional regulator (PPAR) and an inducible expression cassette.

The present international preliminary examination report refers to the following documents (D) cited in the international preliminary search report as being particularly relevant to the assessment of the novelty and

inventive step of the subject matter of the claims. The numbering given below will be used throughout the rest of the procedure.

D1: BARDOT, O., ET AL.: 'PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme', BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 192, no. 1, 1993, pages 37-45, XP000907578, ORLANDO, FL, US

D2: WO 96 01317 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI)
18 January 1996 (1996-01-18)

The other documents cited as "X" documents in the international search report have also been considered likely to anticipate the subject matter of the claims and have been taken into account in the assessment of the inventive step of the present application because their contribution is similar to that of documents D1 and D2.

Novelty (PCT Article 33(2))

Document D1 relates to the revelation of a PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) response sequence upstream from the bifunctional peroxisome enzyme. It has been shown that PPAR α and RXR α (retinoic acid receptor X) form a heterodimer capable of specifically binding to said sequence, thereby demonstrating the important part played by PPAR α in mediating the activity of peroxisome proliferators.

Document D2 describes the co-transfection of CV-1 cells with an expression vector of a PPAR and an expression vector of a reporter gene including three copies of the

PPAR response element upstream from the thymidine kinase promoter that governs the expression of the luciferase gene in response to the PPAR ligand, Wy 14.643. Document D2 also relates to various uses of said invention, particularly a method for recombinant PPAR expression as well as a method for screening for PPAR ligands. The ligands can be used as a lipid metabolism regulator.

The International Preliminary Examining Authority (IPEA) is of the opinion that, because of a lack of clarity (see the complementary observations in Box VIII), claims 1-3, 5, 7-14, 15, 17, 23-26, 28, 29, 32 and 33 lack novelty (PCT Article 33(2)).

(i) Document D1 describes the construction of two plasmid vectors of which one includes the gene coding for the luciferase upstream from which the beta globin promoter is located, as well as a PPAR α response element consisting of three PPAR α binding sites (TGACCT, a "functional variant" of sequences SEQ ID NO 1 and 5), while the other vector includes the gene coding for PPAR α . A third vector including the gene coding for RXR α is also described. These vectors are used in mouse liver cell co-transfection experiments to study the part played by PPAR α in the regulation of the expression of the gene coding for luciferase in the presence or absence of Wy-14,643, a PPAR α ligand (page 38, "plasmid constructions" and "transfection assays"; page 39, "results", lines 7-10; figures 1 and 4; page 44, "discussion", lines 3-10). Therefore, document D1 deprives claims 1-3, 5, 7-14, 15, 17, 23-26, 28 and 29 of novelty. Since document D2 describes the same "functional variant" as document D1, it too is considered to deprive said claims of novelty.

(ii) Claims 32 and 33 relate to a method for identifying PPAR ligands by contacting a cell modified by means of the composition or vector claimed, as well as a test molecule, and revealing the expression of a gene of interest.

Document D2 describes a method for screening PPAR γ AND δ receptor agonists, which method includes a step of contacting a cell with the test molecule, where said cell expresses one of said receptors as well as a reporter gene of which the coding sequence is linked to a PPAR response element. Said method further includes measuring the level of expression of the reporter gene, where said expression reflects the transcriptional activity of the PPAR and thus the presence of an active ligand/receptor complex (page 28, lines 4-9 and 34-35, claim 14).

It follows that document D2 deprives claims 32 and 33 of novelty.

Similarly, the novelty of the subject matter of these claims cannot be acknowledged in view of the description of similar methods in a number of the other documents cited in the international search report.

(iii) None of the prior art documents cited in the preliminary search report describes or suggests the composition, the method, the polypeptide and the nucleic acid forming the respective subject matter of claims 4, 6, 16, 18-22, 30 and 31, which therefore comply with the requirements of novelty of PCT Article 33(2).

Inventive step (PCT Article 33(3))

In the light of the prior art relating to PPARs, it appears that even if the applicant were to restrict the subject matter claimed to sequences SEQ ID NO 1 and 5

alone, said subject matter would still fail to comply with the requirements of PCT Article 33(3). Indeed, the various PPARs recognise various PPAR response elements. The selection of sequences SEQ ID NO 1 and 5 appears to be completely arbitrary and does not contribute to one or more particular technical effects or advantages. Furthermore, sequence SEQ ID NO 5 includes the sequence complementary to the PPAR response element of documents D1 and D2 (TGACCT), and thus also leads to a lack of inventive step in the above-mentioned claims.

(i) Claim 6 relates to the use of an adeno-associated virus as a vector for the claimed genetic construction. The use of such a vector is completely arbitrary since it does not lead to a particular technical effect that might be considered to make a positive contribution to an inventive step. Therefore, claim 6 fails to comply with the requirements of PCT Article 33(3).

(ii) The insertion of two (or more) expression cassettes into a single vector is one of many alternatives known to a person skilled in the art seeking to co-express various genes. Moreover, assembling two expression cassettes in mutually reversed positions to form a "controllable two-way promoter" is part of known practice in the technical field in question and thus makes no contribution to an inventive step. It follows that claims 4 and 18-22 are not inventive.

(iii) Claim 27 relates to the claimed method enabling the controlled expression of a nucleic acid in a muscle cell. The selection of the cell type used is arbitrary and does not involve the exercise of any particular inventive skill, especially since it is the only cell type to have been used with the genetic constructions claimed. It

follows that claim 27 is not inventive.

None of the prior art documents cited in the preliminary search report describes or suggests the composition, the polypeptide and the nucleic acid forming the respective subject matter of claims 16, 30 and 31, which therefore comply with the requirements of inventive step of PCT Article 33(3).

Industrial applicability (PCT Article 33(4))

The applicant's attention is drawn to the fact that there are no uniform criteria in the PCT Contracting States for determining whether claims 28 and 33 are industrially applicable. Patentability may also be dependent on the way in which the claims are worded. Therefore, the European Patent Office does not consider the subject matter of use claims relating to the *in vivo* therapeutic or diagnostic use of a compound to be industrially applicable.

However, claims 1-27 and 29-32 comply with the requirements of PCT Article 33(4) and are thus industrially applicable.

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

The following objections are raised under the terms of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3 relating to the clarity of the claims.

(i) The subject matter of a claim must be clear from the wording of the claim alone and must define the subject matter for which protection is sought in terms of technical features (see the PCT International Preliminary Examination Guidelines, III-4.2).

The IPEA is of the opinion that the terms "a nucleic acid", "element" and "functional variants" are vague and equivocal.

Similarly, characterising a product merely in terms of its name (such as PPAR, modified PPAR or RXR) or function (e.g. promoter, inducible promoter, controllable two-way promoter, response element, binding site, non-essential region, amplifier region, PPAR ligand) with no real technical meaning fails to comply with the requirements of PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3.

Furthermore, since the response elements, promoters, binding sites, ligands, etc., are chemical molecules, they should be characterised clearly and unambiguously in terms of their nucleotide sequence or chemical structure, i.e. by reference to their specific SEQ ID NO and/or a figure. It is therefore necessary to reword claims 1-4, 7-22 and 30-33 so as to disclose the invention using technical features and thus dispel any uncertainty.

(ii) It is difficult to imagine how two "elements" that are part of a single composition could be used "separately" but not "at different times". Claims 1 and 2

VIII. Certain observations on the international application

are thus unclear.

(iii) Claim 5 mentions the use of the "genetic construction" according to claim 3, which in turn describes the use of "separate genetic constructions". Therefore, the content of claim 5 is inconsistent with claim 3.

(iv) The term "functional variants" used in claims 8 and 9 means that any sequence which has at least one nucleotide from sequences SEQ ID NO 1 and 5 and for which a PPAR has affinity meets the criteria of claims 8 and 9. Furthermore, such a term suggests that SEQ ID NO 1 is a "functional variant" of SEQ ID NO 5 (and vice versa).

(v) The term "deleted" used in claim 11 does not specify the extent of the deletion in question. Therefore, the deletion of one or more regions that are not essential for transcription can be interpreted as the deletion of a nucleotide as long as such deletion does not affect the transcriptional activity.

(vi) Claims 1 and 21 do not clearly define the subject matter for which protection is sought (PCT Article 6 in combination with PCT Rule 6.3(a)). Indeed, said claims do not mention the orientation of the "PPAR response elements", meaning that it is impossible to tell what gene will have its expression regulated mainly by means of said "PPAR response elements" within a vector including a "controllable two-way promoter".

(vii) The expression "modified cell" used in claim 29 provides no information on the type of modification that



VIII. Certain observations on the international application

has been carried out on the cell in terms of technical features. A product claim in which the product is defined in terms of the method for making same is not acceptable unless the product as such is novel and involves an inventive step, which is not the case with the subject matter of claim 29.

Furthermore, merely contacting a cell with a vector (even a viral vector) is not sufficient to modify the cell. The subject matter of claim 29 has been insufficiently described.

(viii) The term "product" used in claim 24 is very vague. It is impossible to determine the nature of the "product" in question from reading the claim.

(ix) The disclosure of claim 33 does not specify to what or to whom the claimed composition or vector is administered in order to identify PPAR ligands. Is it a bacterium? A yeast? A plant? A mouse?



...

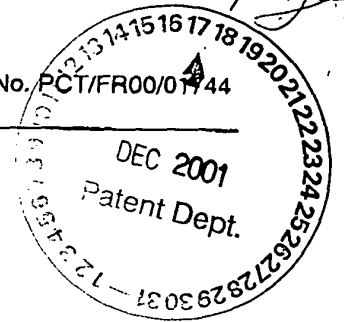
J A KEMP & CO

No. 6488 P. 113/127

ST 99021 / *Jag*

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/FR00/01744



4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/fig

5. ☐ This report has been written disregarding (some of) the amendments, which were considered as going beyond the description of the invention, as filed, as is indicated below (Rule 70.2(c)):

(All replacement sheets comprising amendments of this nature should be indicated in point 1 and attached to this report).

6. Additional observations, if necessary:

II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:

- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed
- ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.

2. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:
see separate sheet

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been and will not be examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 28,33 see citations and explanations.

because:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/FR00/01744

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 28,33 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):
see separate sheet
- ☐ the description, claims or drawings (indicate particular elements below) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (specify):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for said claims Nos.
2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:
- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty	Yes:	Claims	4, 6, 16, 18-22, 27, 30-31
	No:	Claims	1-3, 5, 7-15, 17, 23-26, 28-29, 32-33
Inventive Step	Yes:	Claims	16, 30-31
	No:	Claims	1-15, 17-29, 32-33
Industrial Applicability	Yes:	Claims	1-27, 29-32
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations
see separate sheet****VIII. Certain observations in the international application**

The following observations on the clarity of the claims, descriptions, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:
see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**International application No. PCT/FR00/01744

Additional remarks regarding point I

This international preliminary examination report was established on the basis of the documents of the present application as well as of sequences SEQ ID No. 1 to SEQ ID No. 28, pages 1-9.

Additional remarks regarding point II

The priority document relating to the present application has been consulted. It appears that all the claims benefit from the right of priority starting from the date of registration of the priority document (22.06.99).

Remarks regarding point III

Claims 28 and 33, in so far as they relate to the in vivo use of a compound for therapeutic or diagnostic purposes, relate to a subject matter considered by this Authority as coming within the field of Rule 67.1 PCT. Consequently, no opinion will be formulated as to the industrial application of the subject matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Additional remarks regarding point V

The present application relates to a composition comprising two elements, one containing a nucleic acid of interest under the control of an inducible promoter consisting, inter alia, of a PPAR response element (SEQ ID No. 1, 5) and of a minimal transcriptional promoter, the other comprising the sequence encoding a PPAR under the control of a transcriptional promoter, it being possible for these two elements to be used simultaneously or spaced out over time. This invention can allow the effective regulation of the expression of nucleic acids in vivo for clinical, therapeutic or diagnostic purposes. The examples describe, inter alia, the construction of various expression plasmids containing promoters inducible by PPARs, it being possible for these promoters to contain several PPAR response elements, the construction of plasmids containing a gene encoding a PPAR modified such that it possesses several ligand binding sites, as well as plasmids comprising both a cassette for expression of the transcriptional regulator (PPAR) and an inducible expression cassette.

The present international preliminary examination report mentions the following documents (D) which were cited in the International Preliminary Search Report as

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/FR00/01744

being of particular interest for evaluating the novelty and the inventive step of the subject matter of the claims. The serial number which is attributed to them below will be used in the remainder of the procedure:

D1: BARDOT, O. ET AL.: 'PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme' BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 192, No. 1, 1993, pages 37-45, XP000907578 ORLANDO, FL US

D2: WO 96 01317 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 18 January 1996 (1996-01-18)

The other documents classified X in the International Search Report were also considered as being capable of anticipating the novelty and for evaluating the inventive step of the present application since their contribution is similar to that of documents D1 and D2.

Novelty Article 33(2) PCT

Document D1 relates to the identification of a PPAR α response sequence (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α) upstream of the bifunctional peroxisomal enzyme gene. It is shown that PPAR α and RXR α (retinoid X receptor) form a heterodimer capable of specifically binding to this sequence, thus demonstrating the important role played by PPAR α in mediating the action of peroxisome proliferators.

Document D2 describes the co-transfection of CV-1 cells with a vector for the expression of a PPAR and a vector for the expression of a reporter gene comprising three copies of the PPAR response element upstream of the thymidine kinase promoter, this promoter governing the expression of the luciferase gene in response to the PPAR ligand, Wy 14.643. This document also relates to the various uses of this invention, in particular a method for the expression of recombinant PPARs as well as a method for screening PPAR ligands. These ligands may be used as a regulator of the metabolism of lipids.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/FR00/01744

The International Preliminary Examination Authority (IPEA) is of the opinion that, because of a lack of clarity (see the additional remarks regarding point VIII), Claims 1-3, 5, 7-14, 15, 17, 23-26, 28-29, 32-33 exhibit a lack of novelty (Article 33(2) PCT).

(i). Thus, document D1 describes the construction of two plasmid vectors, one comprising the gene encoding luciferase upstream of which there is the beta-globin promoter as well as a PPAR α response element consisting of three PPAR α binding sites (TGACCT, a "functional variant" of sequences SEQ ID No. 1 and 5), the other vector comprising the gene encoding PPAR α . A third vector comprising the gene encoding RXR α is also described. These vectors are used in experiments for cotransfections of mouse hepatic cells for studying the role of PPAR α in the regulation of the expression of the gene encoding luciferase in the presence or in the absence of Wy-14,643, a PPAR α ligand (page 38, "plasmid constructions" and "transfection assays"; page 39, "results" lines 7-10; Figure 1, 4; page 44 "discussion" lines 3-10).

Thus, document D1 anticipates the novelty of Claims 1-3, 5, 7-14, 15, 17, 23-26, 28-29.

Document D2, presenting the same "functional variant" of PPRE (TGACCT) as document D1, is also capable of anticipating the novelty of these same claims.

(ii). Claims 32 and 33 relate to a method for identifying PPAR ligands comprising bringing into contact a cell modified by the composition or the vector claimed as well as a test molecule and identifying the expression of a gene of interest.

Document D2 presents a method for screening agonists for the PPAR γ and δ receptors, this method comprising a step of bringing a cell into contact with the test molecule, this cell expressing one of the said receptors as well as a reporter gene whose coding sequence is linked to a PPAR response element. This method comprises, in addition, measuring the level of expression of the reporter gene, this expression reflecting the transcriptional activity of the PPAR and consequently the presence of an active receptor-ligand complex (page 28, lines 4-9 and page 34-35, Claim 14).

Document D2 consequently anticipates the novelty of Claims 32 and 33. Likewise, the novelty of the subject matter of these claims cannot be recognized in the light of the description of similar methods in several of the other documents cited in the International Search Report.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/FR00/01744

(iii). None of the prior art documents cited in the preliminary search report describes or suggests the composition, the vector, the method, the polypeptide and the nucleic acid which are the subject matter of claims 4, 6, 16, 18-22, 30 and 31, respectively, which consequently satisfy the conditions of novelty of Article 33(2) PCT.

Inventive step (Article 33(3) PCT)

On reading the prior art relating to the PPARs, it appears that even if the Applicant were to limit the subject matter claimed solely to sequences SEQ ID No. 1 and 5, it would not satisfy the conditions of Article 33(3) PCT. Indeed, the different PPARs recognize various PPAR response elements. The choice of sequences SEQ ID No. 1 and 5 appears to be purely arbitrary and does not contribute to (a) particular advantageous technical effect(s). Furthermore, sequence SEQ ID No. 5 comprises the sequence complementary to the PPAR response element of documents D1 and D2 (TGACCT), which would also result in a lack of inventive step for the abovementioned claims.

(i). Claim 6 relates to the use of an adeno-associated virus as vector for the genetic construct claimed. The use of such a vector is purely arbitrary in the light of the fact that it does not confer any particular technical effect which may be considered as a positive contribution to the inventive step. Consequently, Claim 6 does not satisfy the conditions of Article 33(3) PCT.

(ii). The insertion of two (or more) expression cassettes into a single vector is one of the many alternatives known to a person skilled in the art for co-expressing different genes. Furthermore, the assembling of two expression cassettes in opposite orientation in order to form a "regulatable bidirectional promoter" is a practice known in the corresponding technical field and consequently makes no contribution to the inventive step. Thus, Claims 4, 18-22 are not inventive.

(iii). Claim 27 relates to the claimed method allowing the regulated expression of a nucleic acid in a muscle cell. The choice of the cell type used is arbitrary and does not reflect a particular inventive step, all the more so since it is the only cell type to have been used with the genetic constructs claimed. Claim 27 is consequently not inventive.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/FR00/01744

None of the prior art documents cited in the preliminary search report describes or suggests the composition, the polypeptide and the nucleic acid which are the subject matter of Claims 16, 30 and 31, respectively, which consequently satisfy the conditions of inventiveness of Article 33(3) PCT.

Industrial application (Article 33(4) PCT)

The Applicant's attention is drawn to the fact that there is no unified criterion in the States which are parties to the PCT for determining whether Claims 28 and 33 are susceptible of industrial application. Patentability may also depend on the manner in which the claims were formulated. Thus, the European Patent Office does not consider as susceptible of industrial application the subject matter of claims for using *in vivo* a compound for therapeutic or diagnostic purposes.

On the other hand, Claims 1-27 and 29-32 which satisfy the conditions of Article 33(4) PCT are susceptible of industrial application.

Additional remarks regarding point VIII

The following objections are stated by virtue of Article 6 PCT in combination with Rule 6.3 PCT regarding the clarity of the claims:

(i). The subject matter of a claim should be clear solely from the wording of this claim and should define the subject matter for which protection is sought by technical characteristics (see Directives for the PCT International Preliminary Examination, III-4.2).

The IPEA is of the opinion that the terms "a nucleic acid", "element" and "functional variants" are vague and ambiguous.

Likewise, the characterization of a product simply by its name (such as PPAR, modified PPAR or RXR) or by its function (such as promoter, inducible promoter, regulatable bidirectional promoter, response element, binding site, nonessential region, enhancer region, PPAR ligand) without a real technical meaning does not satisfy the requirements of Article 6 PCT in combination with Rule 6.3 PCT. In addition, the response elements, promoters, binding sites, ligands and the like being chemical molecules, they must be clearly and unambiguously characterized by their nucleotide sequence/their chemical structure, that is to say with reference to their specific SEQ ID No. and/or to a figure number.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/FR00/01744

It is consequently necessary to reformulate Claims 1-4, 7-22, 30-33 in order to disclose the invention with the aid of technical characteristics and thus remove any uncertainty.

(ii). It is difficult to understand a use "separately" and not "spaced out over time" of two "elements" belonging to the same composition. Claims 1 and 2 therefore lack clarity.

(iii). Claim 5 mentions the use of "the genetic construct" according to Claim 3 which for its part describes the use of "distinct genetic constructs". The content of Claim 5 is consequently not consistent with Claim 3.

(iv). The expression "functional variants" in Claims 8 and 9 implies that any sequence possessing at least one nucleotide of sequences SEQ ID No. 1 and 5 and for which a PPAR exhibits affinity fulfils the conditions of Claims 8 and 9.

Furthermore, such an expression implies that sequence SEQ ID No. 1 is a "functional variant" of sequence SEQ ID No. 5 (and vice versa).

(v). The term "deleted" in Claim 11 gives no clarification as to the extent of the deletion in question. Thus, the deletion of (a) region(s) not essential for the transcription may be interpreted as the deletion of a nucleotide as long as it does not affect the transcriptional activity.

(vi). Claims 1 and 21 do not clearly define the subject matter of the protection applied for (Article 6 PCT in combination with Rule 6.3(a) PCT). Indeed, they do not mention the orientation of the "PPAR response elements" such that it is impossible to know the gene whose expression will be mainly regulated by means of these "PPAR response elements" within a vector comprising a "regulatable bidirectional promoter".

(vii). The expression "modified cell" in Claim 29 gives no information as to the type of modification to which the cell has been subjected in terms of technical characteristics. A product claim in which the product is defined by its method of manufacture is only acceptable if the product as such is novel and involves an inventive step, which is not the case for the subject matter of Claim 29.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**International application No. PCT/FR00/01744

Furthermore, the mere bringing of a cell into contact with a vector (even viral) is not sufficient for the said cell to be modified. The subject matter of Claim 29 is insufficiently described.

(viii). The term "product" in Claim 24 is very vague. It is impossible to determine the nature of the "product" in question on reading the claim.

(ix). The wording of Claim 33 does not specify to what/whom the composition or the vector claimed is administered in order to identify PPAR ligands. A bacterium? A yeast? A plant? A mouse?

WO 00/78986

PCT/FR00/01744

71

AMENDED CLAIMS

[received by the international office on 3 January 2001 (03.01.01);

original claims 1-30 replaced by new claims 1-33 (4 pages)]

- 5 1. Composition comprising:
- (a) a first element comprising a nucleic acid
of interest under the control of an inducible promoter
comprising a PPAR response element and a minimal
transcriptional promoter, and
- 10 (b) a second element comprising a nucleic
acid encoding a PPAR under the control of a
transcriptional promoter,
for their use simultaneously, separately or spaced out
over time.
- 15 2. Composition according to Claim 1,
characterized in that it comprises in addition:
- (c) a ligand for PPAR,
for a use simultaneously, separately or spaced out over
time.
- 20 3. Composition according to Claim 1 or 2,
characterized in that the elements (a) and (b) are
carried by distinct genetic constructs.
4. Composition according to Claim 1 or 2,
characterized in that the elements (a) and (b) are
- 25 assembled in the same genetic construct.

WO 00/78986

PCT/FR00/01744

72

5. Composition according to Claim 3 or 4, characterized in that the genetic construct is a plasmid or viral vector.

6. Composition according to Claim 5, characterized in that the viral vector is an adeno-associated virus (AAV).

7. Composition according to one of Claims 1 to 6, characterized in that the PPAR response element comprises one or more PPAR-binding sites.

8. Composition according to Claim 7, characterized in that the PPAR response element comprises one or more sites having the sequence SEQ ID NO:1 or functional variants of this sequence.

9. Composition according to Claim 7, characterized in that the PPAR response element comprises one or more sites having the sequence SEQ ID NO:5 or functional variants of this sequence.

10. Composition according to Claims 7 to 9, characterized in that the response element comprises up to 30 binding sites, preferably from 3 to 20, more preferably from 5 to 15.

11. Composition according to one of Claims 1 to 10, characterized in that the minimal promoter is a promoter of a cellular or viral gene deleted for the region(s) not essential for transcriptional activity.

WO 00/78986

PCT/FR00/01744

73

12. Composition according to one of Claims 1 to 11, characterized in that the inducible promoter comprises, in addition, an enhancer region.

13. Composition according to one of Claims 1 to 12, characterized in that the minimal promoter and the PPAR response element are in the same orientation.

14. Composition according to one of Claims 1 to 12, characterized in that the minimal promoter and the PPAR response element are in the opposite
10 orientation.

15. Composition according to one of Claims 1 to 14, characterized in that the nucleic acid encoding a PPAR encodes a PPAR α or a PPAR γ .

16. Composition according to one of Claims 1 to 15, characterized in that the nucleic acid encoding a PPAR encodes a modified PPAR comprising several
15 ligand-binding sites.

17. Composition according to one of Claims 1 to 16, characterized in that it comprises, in addition,
20 an element (d) comprising a nucleic acid encoding an RXR under the control of a transcriptional promoter.

18. Vector comprising an element (a) and an element (b) according to Claim 1.

19. Vector according to Claim 18,
25 characterized in that the elements (a) and (b) are in the opposite orientation.

WO 00/78986

PCT/FR00/01744

74

20. Vector according to Claim 18 or 19,
characterized in that the inducible promoter of the
element (a) and the transcriptional promoter of the
element (b) are assembled in the vector to form a
5 regulable bidirectional promoter.

21. Vector according to Claim 20,
characterized in that it comprises, in the 5'→3'
direction, a first nucleic acid encoding a PPAR, a
first minimal transcriptional promoter controlling the
10 expression of the said first nucleic acid, one or more
PPAR response elements, a second minimal
transcriptional promoter and, under the control of the
said second minimal transcriptional promoter, a second
nucleic acid encoding a product of interest.

15 22. Vector according to one of Claims 18 to
21, characterized in that it comprises, in addition, an
element (d) according to Claim 17.

23. Use of a composition according to one of
Claims 1 to 17 or of a vector according to one of
20 Claims 18 to 22 for expressing a nucleic acid of
interest in a cell ex vivo or in vitro.

24. Use of a composition according to one of
Claims 1 to 17 or of a vector according to one of
Claims 18 to 22 for the preparation of a product
25 intended for expressing a nucleic acid of interest in a
cell in vivo.

WO 00/78986

PCT/FR00/01744

75

25. Method for the regulated expression of a nucleic acid in a cell, in vitro or ex vivo comprising bringing the said cell into contact with a composition according to one of Claims 1 to 17 or a vector
5 according to one of Claims 18 to 22.

26. Method according to Claim 25, characterized in that it is a mammalian, preferably human cell.

27. Method according to Claim 26,
10 characterized in that it is a muscle cell.

28. Method for regulating the expression of a nucleic acid in vivo comprising the administration of a composition according to one of Claims 1 to 17 or of a vector according to one of Claims 18 to 22.

15 29. Cell modified by bringing into contact with a composition according to one of Claims 1 to 17 or a vector according to one of Claims 18 to 22.

30. Modified PPAR comprising several ligand-binding sites.

20 31. Nucleic acid encoding a PPAR according to Claim 30.

32. Method for identifying PPAR ligands, comprising the bringing of a cell according to Claim 29 into contact with a test molecule and the detection of
25 the expression of the nucleic acid of interest.

WO '00/78986

PCT/FR00/01744

76

33. Method for identifying PPAR ligands in vivo, characterized in that there is administered a composition according to one of Claims 1 to 17 or a vector according to one of Claims 18 to 22 as well as a test molecule, and in that the expression of the nucleic acid of interest is detected.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
28 décembre 2000 (28.12.2000)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 00/78986 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷: C12N 15/85,
A61K 48/00, C07K 14/705, C12N 5/10

60/149,721

20 août 1999 (20.08.1999) US

(21) Numéro de la demande internationale:

PCT/FR00/01744

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US): AVEN-
TIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond Aron,
F-92160 Antony (FR).

(22) Date de dépôt international: 22 juin 2000 (22.06.2000)

(72) Inventeurs; et

(25) Langue de dépôt: français

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement): DARTEIL,
Raphaël [FR/US]; 1585 Campus Drive, Berkeley, CA
94708 (US). CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel
Voisin, F-92330 Sceaux (FR). STAELS, Bart [BE/BE];
155, avenue d'Huart, F-1950 Kraainem (FR). MAH-
FOLUL, Abderrahim [FR/FR]; 41, rue des Bergers,
F-94440 Marolles en Brie (FR).

(26) Langue de publication: français

(30) Données relatives à la priorité:

99/07957

22 juin 1999 (22.06.1999) FR

[Suite sur la page suivante]

(54) Title: REGULATION SYSTEM OF EXPRESSION USING NUCLEAR PPAR RECEPTORS

(54) Titre: SYSTEME DE REGULATION DE L'EXPRESSION UTILISANT LES RECEPTEURS NUCLEAIRES PPAR

		A	Facteur d'induction par le BRL49653	B	Pourcentage de hCMV-IE
1		+	x 13		27 %
2		+	x 9		6 %
3		+	x 31		9 %
4		+	x 8		108 %
5		+	x 9		38 %
6		+	x 14		2 %
7		+	x 34		4 %
8		+	x 31		6 %
9		+	x 33		4 %

C
□ : promoteur SV40

D
□ : promoteur TK (-105 / +56)

E
□ : promoteur CMV (-54 / +48)

■ : sites J
Ape A-D

□ : luc+

□ : hPPARγ2

□ : hPPARγ2γ2

■ : poly A

A...BRL49653 INDUCTION FACTOR

B...hCMV-IE PERCENTAGE

C...SV40 PROMOTER

D...TK(-105/+56) PROMOTER

E...CMV(-54/+48) PROMOTER

(57) Abstract: The invention concerns novel methods and compositions for the pharmacological regulation of the expression of transgenes. More particularly, it concerns a composition comprising: (a) a first element comprising a nucleic acid of interest under the control of an inducible promoter comprising an element containing a response element to a PPAR and a minimal transcriptional receptor; and (b) a second element comprising a nucleic acid coding for a PPAR under the control of a transcriptional promoter, for simultaneous, separate or prolonged use. The invention concerns the use of said compositions and methods in the experimental, clinical, therapeutic or diagnostic fields.

[Suite sur la page suivante]

WO 00/78986 A1



(74) Mandataire: LECCA, Patricia; Aventis Pharma S.A.,
Direction Brevets, 20, avenue Raymond Aron, F-92165
Antony Cedex (FR).

(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(81) États désignés (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

Publiée:

- Avec rapport de recherche internationale.
- Avec revendications modifiées.

Date de publication des revendications modifiées:

19 avril 2001

(84) États désignés (régional): brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(57) Abrégé: La présente invention concerne de nouvelles méthodes et compositions pour la régulation pharmacologique de l'expression de transgènes. Elle concerne plus particulièrement une composition comprenant: (a) un premier élément comprenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible comprenant un élément de réponse à un PPAR et un promoteur transcriptionnel minimal, et (b) un deuxième élément comprenant un acide nucléique codant un PPAR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel, en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps. L'invention concerne l'utilisation de ces compositions et méthodes dans les domaines expérimentaux, cliniques, thérapeutiques ou diagnostiques.

SYSTEME DE REGULATION DE L'EXPRESSION UTILISANT LES RECEPTEURS NUCLEAIRES PPAR

La présente invention concerne le domaine de la biologie. Elle concerne notamment le domaine de la régulation de l'expression de gènes et, plus particulièrement, elle décrit la mise au point et le développement d'un nouveau système de régulation pharmacologique de l'expression de transgènes. L'invention repose notamment sur l'utilisation de constructions d'origine humaine pour activer la transcription du transgène. L'invention décrit ainsi de nouvelles compositions, constructions et méthodes permettant la régulation efficace de l'expression d'un acide nucléique in vitro, ex vivo ou in vivo, par exemple dans les cellules musculaires. Les applications qui découlent de la présente invention sont nombreuses, dans les domaines expérimentaux, cliniques, thérapeutiques ou diagnostiques, par exemple.

Le contrôle du niveau et de la durée de l'expression des transgènes est nécessaire pour de nombreuses applications. Ainsi, en thérapie génique, le succès de la thérapie peut requérir un dosage spécifique de la protéine synthétisée à partir du transgène. De même, la production de protéines recombinantes in vitro peut être améliorée en utilisant des systèmes d'expression inductibles, permettant par exemple de découpler les phases de croissance et de production. La construction d'animaux transgéniques, l'étude des effets d'un gène ou de la biodisponibilité d'une protéine, etc. sont autant de situations dans lesquelles un contrôle approprié de l'expression génétique peut être mis en œuvre et apporter des améliorations.

Différents régulateurs de transcription artificiels ont été conçus dans l'art antérieurs, activés par une molécule xénobiotique qui se lie sur les séquences promotrices de la transcription du transgène.

Une première illustration de ces régulateurs a été construite par fusion du répresseur Lac de E. coli avec le domaine transactivateur de VP16 du virus herpès simplex (HSV). Deux versions de ces régulateurs existent, l'une pouvant être activée par l'isopropyl b-D-thiogalactoside (IPTG) et l'autre inactivée par l'IPTG (Baim S. et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88** (1991) 5072-5076 ; Labow M. et coll., *Mol. Cell. Biol.*, **10** (1990) 3343-3356).

Un autre système a été construit par fusion du répresseur Tet de E. coli avec le domaine transactivateur de VP16 de HSV. Il existe également deux versions de ces régulateurs, l'une pouvant être activée par la tétracycline ou ses dérivés et l'autre inactivée par ces mêmes molécules (Gossen M. et Bujard H.,
5 *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (1992) 5547-5551; Gossen M. et coll., *Science*,
268 (1995) 1766-1769).

Un autre système a été construit par fusion du domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 de S. cerevisiae avec le domaine de liaison au ligand du récepteur humain à la progestérone et le domaine transactivateur de VP16 de
10 HSV, cette version est activée par un analogue de la progestérone tel que le RU486 (Wang Y. et coll., *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91** (1994) 8180-8184). Une fusion du récepteur à l'ecdysone de drosophile avec le domaine transactivateur de VP16 de HSV a également été décrite, activée par l'ecdysone et les analogues de cette hormone stéroïdienne (No D. et coll., *Proc Natl Acad Sci U S*
15 *A*, **93** (1996) 3346-3351). Un autre système tire parti de la capacité de certaines molécules immunosuppressives (cyclosporine A, rapamycine et ses dérivés) de promouvoir l'association de certaines protéines cellulaires. Un régulateur transcriptionnel est alors constitué de deux sous-unités protéiques, la première peut être formée par la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN chimérique et de
20 trois copies de la protéine humaine FKBP et la deuxième par la fusion du domaine de liaison à la rapamycine de la protéine humaine FRAP et du domaine transactivateur de la sous-unité p65 de NFkB humain. Ce régulateur transcriptionnel est activé par la rapamycine qui permet la dimérisation des deux sous-unités (Rivera V. et coll., *Nat. Med.*, **2** (1996) 1028-1032).

25 Même si ces systèmes permettent d'obtenir des niveaux de régulation satisfaisants dans certains tissus, ils présentent néanmoins certains inconvénients qui limitent leurs conditions d'utilisation. Ainsi, ces régulateurs transcriptionnels sont des protéines xénogéniques chez l'homme. Elles sont en effet constituées de fragments protéiques provenant de bactérie, de virus, de
30 levure ou d'insecte ou, lorsque les domaines protéiques sont d'origine humaine, leur jonction crée des séquences étrangères à l'homme. Ces domaines

protéiques peuvent donc induire une réaction immunitaire cytotoxique, entraînant la destruction des cellules qui expriment le gène d'intérêt sous contrôle du régulateur transcriptionnel xénogénique, et ainsi l'arrêt de l'expression du transgène. Cette situation peut imposer le recours à des administrations répétées du gène thérapeutique, ce qui constitue un inconvénient important, notamment lorsque cela implique un acte chirurgical traumatique, et qui n'est pas toujours efficace, notamment lorsque le vecteur du gène thérapeutique est un virus dont la première injection provoque une réaction immunitaire. En outre, les niveaux d'expression observés avec les systèmes de régulation de l'art antérieur ne sont pas toujours satisfaisants.

Il existe donc un besoin d'un système de régulation de l'expression amélioré, compatible avec un usage in vivo, utilisable dans différents tissus, et assurant des niveaux d'expression importants à l'état activé. La présente invention apporte une solution à ces problèmes.

La présente invention concerne en effet un système de régulation utilisant un activateur d'origine humaine. Ceci doit permettre d'éviter les administrations répétées du gène thérapeutique.

La présente invention décrit en particulier un système amélioré d'expression inductible utilisant les récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptors) comme régulateurs transcriptionnels. L'utilisation de PPRE dans un système d'expression hépatospécifique a été décrit dans la demande WO 98/21349. Le système amélioré selon l'invention permet à présent de produire le régulateur transcriptionnel (une protéine PPAR d'origine humaine, et donc essentiellement non xénogénique chez l'homme), et le promoteur inductible, qui contrôle l'expression du transgène, est composé d'une part d'un promoteur minimum et d'autre part d'un élément de réponse aux PPAR (PPRE). Le système de l'invention est activable, in vitro et également in vivo, en particulier dans le muscle, par les ligands spécifiques des PPAR. De plus, le niveau d'expression du transgène, obtenu après activation, est comparable à celui d'un promoteur fort comme le promoteur hCMV-IE.

Le système selon la présente invention présente donc de nombreux avantages, à la fois en termes d'induction importante, de tolérance (notamment pour un usage in vivo), de force et de conditions d'utilisation.

L'invention décrit donc de nouvelles constructions pour la réalisation et la
5 mise en œuvre de ce système, notamment des régions promotrices, des cassettes d'expression et des plasmides. L'invention décrit aussi des constructions nouvelles de PPAR permettant un contrôle amélioré de l'expression de gènes, ainsi que des combinaisons de ces différentes constructions. L'invention montre en outre que ces méthodes et compositions
10 permettent un contrôle et une régulation importants de l'expression in vitro et in vivo. L'invention concerne aussi des cellules comprenant des constructions de l'invention, ainsi que des méthodes de criblage de composés ligands des PPAR, par exemple.

Plus particulièrement, un premier objet de l'invention réside dans une
15 composition comprenant:

(a) un premier élément comprenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible comprenant un élément de réponse à un PPAR et un promoteur transcriptionnel minimal, et

(b) un deuxième élément comprenant un acide nucléique codant un PPAR
20 sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel, en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Dans un mode plus particulier, les compositions de l'invention comprennent en outre:

25 (c) un ligand de PPAR, également en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Avantageusement elles comprennent en outre un élément (d) comprenant un acide nucléique codant un récepteur rétinoïde X (RXR) sous le contrôle d'un
30 promoteur transcriptionnel.

L'expression en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps indique que les éléments (a), (b), le cas échéant (c), et/ou (d), peuvent être préparés séparément, conditionnés séparément, et utilisés séquentiellement, pour permettre le contrôle de l'expression de l'acide nucléique d'intérêt. Typiquement, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d) sont préparés et conditionnés ensemble, alors que le composé c) est conditionné séparément et utilisé de manière espacée dans le temps avec (a) et (b), et éventuellement (d), la combinaison de ces différents éléments dans une cellule, un tissu, un organe, etc. conduisant à l'effet de régulation d'expression recherché.

A cet égard, dans un mode particulier de réalisation d'une composition de l'invention, les éléments (a) et (b) et éventuellement (d) sont portés par des constructions génétiques distinctes.

Dans un autre mode particulier et préféré de réalisation d'une composition de l'invention, les éléments (a) et (b) et éventuellement (d) sont assemblés dans une même construction génétique. La présente invention décrit ainsi des constructions génétiques complexes permettant l'expression d'un produit d'intérêt et d'un PPAR. Ces constructions sont particulièrement avantageuses puisqu'elles comportent, à elles seules, l'ensemble des éléments génétiques nécessaires à l'expression régulée de l'acide nucléique d'intérêt.

La ou les constructions génétiques peuvent être de nature et/ou d'origine variées, notamment plasmidique, épisomique, chromosomique, virale, phagique, etc. Préférentiellement, la construction génétique est un vecteur plasmidique ou viral.

A titre illustratif de plasmides portant séparément les éléments (a) ou (b) on peut citer par exemple les plasmides JxnS-TK-pGL3, JxnAS-TK-pGL3, DR1xnS-TK-pGL3, DR1xnAS-TK-pGL3, JxnAS-CMV-pGL3, pSG5-hPPARg2g2, ou Jx10AS-CMV-EF-pGL3, qui seront décrits en détails plus loin.

A titre illustratif de plasmides dans lesquels les éléments (a) et (b) ont été assemblés, on peut citer par exemple les plasmides Jx5AS-TK-Luc-hPPARg2,

SV-g2-J10-C-pGL3, hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 ou hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3, qui seront décrits en détails plus loin.

Comme exemple de vecteur viral, on peut citer notamment un adénovirus recombinant, un rétrovirus recombinant, un AAV, un herpès virus, un virus de la vaccine, etc., dont la préparation peut être réalisée selon les méthodes connues de l'homme du métier.

L'agencement et la structure des constructions génétiques seront décrits plus en détail dans la suite du texte.

A cet égard, comme indiqué ci-avant, l'élément (a) comprend un promoteur inductible comprenant au moins:

- un élément de réponse à un PPAR, et
- un promoteur transcriptionnel minimal.

Un élément de réponse à un PPAR (PPRE, "Peroxisome Proliferator Response Element") est une région d'acide nucléique capable de fixer un PPAR, la liaison du PPAR pouvant ensuite médier un signal vers des régions nucléiques voisines. Un élément de réponse à un PPAR est donc une région d'acide nucléique capable de lier les PPAR. Pour la mise en œuvre de l'invention, l'élément de réponse à un PPAR comprend plus particulièrement un ou plusieurs sites de liaison du PPAR. De tels sites de liaison ont été décrits dans l'art antérieur, comme par exemple dans différents promoteurs humains (gène de l'apolipoprotéine AII, par exemple). De tels sites peuvent également être construits artificiellement, et testés pour leurs propriétés de PPRE, comme il est décrit ci-après.

Dans un mode particulier de réalisation, l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence TCAACCTTTACCCTGGTAG (SEQ ID NO:1) ou de variants fonctionnels de cette séquence. La séquence SEQ ID NO:1 correspond à la région J du promoteur de l'apoAII humain (nucléotides -734 à -716).

Dans un autre mode particulier de réalisation, l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence AGGTCAAAGGTCA (SEQ

ID NO:5) ou de variants fonctionnels de cette séquence. La séquence SEQ ID NO: 5 correspond à la région consensus DR1.

Le terme variant fonctionnel désigne toute séquence modifiée conservant les propriétés de PPRE telles que mentionnées ci-dessus, c'est-à-dire notamment la capacité de lier un PPAR. Les modifications peuvent comprendre une ou plusieurs additions, mutations, délétions et/ou substitutions de nucléotides dans la séquence considérée. Ces modifications peuvent être introduites par les méthodes classiques de la biologie moléculaire, telles que notamment la mutagénèse dirigée ou, plus pratiquement, par synthèse artificielle de la séquence dans un synthétiseur. Généralement, les variants conservent au moins 50% des résidus de la séquence initiale indiquée. Plus préférentiellement, les variants possèdent des modifications affectant moins de 5 nucléotides dans la séquence considérée. Les variants ainsi obtenus sont ensuite testés pour leur activité de PPRE. Cette propriété peut être vérifiée de différentes façons, et notamment:

- (i) par mise en contact de la séquence test avec un PPAR, et un récepteur rétinoloïde X (RXR), préférentiellement dans un test acellulaire, et la détection de la formation d'un complexe (par exemple par retard de migration sur gel);
- (ii) par insertion de la séquence test dans une cassette d'expression comprenant un promoteur minimal et un gène reporter, introduction de la cassette dans une cellule, et détection (le cas échéant dosage) de l'expression du gène reporter en présence et en l'absence d'un PPAR et d'un ligand d'un PPAR;
- (iii) par toute autre technique connue de l'homme du métier, permettant de mettre en évidence l'interaction entre un acide nucléique et une protéine, par exemple.

Un variant est considéré comme fonctionnel au sens de la présente invention lorsque l'activité mesurée, par exemple en (ii) ci-dessus, est préférentiellement au moins égale à 50% de celle mesurée avec un site de séquence SEQ ID NO:1 ou 5, plus préférentiellement au moins égale à 75%. Des variants fonctionnels de sites de liaison de PPAR au sens de l'invention

sont décrits par exemple dans Juge-Aubry et al. (J. Biol. Chem. 272 (1997) 25252) et dans Nakshatri et al. (NAR 26 (1998) 2491), incorporés à la présente par référence.

Les récepteurs rétinoïdes X (RXR) sont codés par trois gènes RXR α , RXR β , et RXR γ , dont l'isolement et la séquence ont été décrits (Mangelsdorf DJ et al. (1990) *Nature* **345**, 224-229 ; Mangelsdorf DJ et al. (1992), *Genes Dev* **6**, 329-344). Préférentiellement, l'élément (d) code pour le RXR α humain.

En ce qui concerne l'hétérodimérisation PPAR/RXR, deux revues peuvent être consultées : Mangelsdorf DJ and Evans RM (1995), *Cell* **83**, 841-850 et Wilson TM and Wahli W (1997), *Current Opinion in Chemical Biology* **1**, 235-241. L'article de Schulman IG et al. (1998), *Molecular and Cellular Biology* **18**, 3483-3494 décrit la transactivation par l'hétérodimère PPAR γ /RXR α .

L'utilisation de l'élément (d) est susceptible de synergiser l'activité de l'élément (b).

Comme indiqué ci-avant, dans les compositions selon l'invention, l'élément de réponse au PPAR peut comprendre plusieurs sites de liaison à un PPAR. Il peut s'agir d'une répétition d'un même site, ou de combinaisons de sites différents, la répétition de sites identiques étant préférée. Plus particulièrement, l'élément de réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus préférentiellement de 5 à 15. Un mode de réalisation préféré de l'invention est une construction comprenant de 10 à 15 sites de liaison, les résultats présentés dans les exemples montrent en effet les propriétés avantageuses de telles constructions en termes d'induction et de niveaux d'expression, notamment dans les cellules musculaires.

Pour la réalisation d'un promoteur inductible selon l'élément (a) des compositions de l'invention, l'élément de réponse au PPAR est associé à un promoteur minimal transcriptionnel. Le promoteur minimal est un promoteur transcriptionnel ayant une activité basale faible ou inexistante, et susceptible d'être augmentée en présence d'un activateur transcriptionnel (l'interaction d'un PPAR activé avec l'élément PPRE). Un promoteur minimal peut donc être un promoteur naturellement faible dans les cellules mammifère, c'est-à-dire

produisant une expression non toxique et/ou non suffisante pour obtenir un effet biologique prononcé. Avantageusement, un promoteur minimal est une construction préparée à partir d'un promoteur natif, par délétion de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle. Ainsi, il s'agit de préférence d'un

5 promoteur comprenant essentiellement une boîte TATA, généralement d'une taille inférieure à 160 nucléotides, centrée autour du codon d'initiation de la transcription. Un promoteur minimal peut ainsi être préparé à partir de promoteurs viraux, cellulaires, forts ou faibles, tels que par exemple le promoteur du gène de la thymidine kinase (TK) du virus de l'herpès, le

10 promoteur immédiat du CMV, le promoteur PGK, le promoteur du gène de la créatine kinase musculaire (MCK), les promoteurs des gènes des différentes isoformes d'actine du muscle squelettique, le promoteur du gène de la desmine, le promoteur du gène de la vimentine, les promoteurs des gènes de chaîne légère ou chaîne lourde de la myosine, etc. Des exemples particuliers de

15 promoteurs minimum sont représentés par les nucléotides -54 à +48 du CMV ou -105 à +56 du promoteur TK, par exemple. Il est entendu que tout variant de ces promoteurs ou construction similaire à partir d'autres promoteurs peut être construit par l'homme du métier et utilisé dans le cadre de la présente invention.

Le promoteur minimal (Pmin), l'élément de réponse au PPAR (PPRE) et

20 l'acide nucléique d'intérêt (AN) sont agencés de manière fonctionnelle dans l'élément (a), c'est-à-dire de sorte que le promoteur minimal contrôle l'expression de l'acide nucléique d'intérêt et que son activité soit régulée par l'élément PPRE. Généralement, ces régions sont donc disposées dans l'ordre suivant, dans l'orientation 5'→3' : PPRE-Pmin-AN. Toutefois, tout autre

25 agencement fonctionnel peut être envisagé par l'homme du métier sans départir de la présente invention.

En outre, les différents domaines fonctionnels ci-dessus peuvent être liés directement les uns aux autres, ou séparés par des nucléotides n'affectant pas

30 nucléotides peuvent être des résidus neutres sur le plan fonctionnel, résultant par exemple d'étapes de clonage (extrémités PCR, sites de restriction, etc.).

Ces nucléotides peuvent aussi posséder des propriétés biologiques, permettant de conférer des caractéristiques ou performances améliorées au système de l'invention (amplificateur de gènes de ménage, amplificateur tissus spécifiques, silenceur, intron, site d'épissage, etc.). A cet égard, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le promoteur inductible comprend en outre une région amplificatrice. Une telle région permet avantageusement d'augmenter les niveaux d'expression de l'acide nucléique d'intérêt. Une telle région amplificatrice (E) est préférentiellement positionnée en 3' du promoteur minimal, entre ce dernier et l'acide nucléique d'intérêt, selon le schéma suivant (5'→3'):

10 PPRE-Pmin-E-AN.

D'autre part, dans les constructions de l'invention, le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR peuvent être présents soit dans la même orientation (c'est-à-dire dans le sens de la transcription), soit en orientation inverse (c'est-à-dire que l'élément de réponse à un PPAR est dans l'orientation antisens par rapport à la transcription par le promoteur Pmin). Comme illustré

15 dans les exemples, ces deux modes de réalisation permettent un contrôle efficace de la régulation de l'expression in vitro comme in vivo.

Comme indiqué ci-avant, l'élément (b) des compositions selon l'invention comprend au moins:

- 20
- un acide nucléique codant un PPAR,
 - sous contrôle d'un second promoteur transcriptionnel.

Les PPAR appartiennent à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires, et sont regroupés dans trois groupes distincts, les PPAR α , PPAR δ (également appelé NUC-1 ou PPAR β) et PPAR γ . L'isolement et la séquence de nombreux PPAR humains ont été décrits dans la littérature (voir notamment

25 Sher T. et coll., *Biochemistry*, **32** (1993) 5598-5604 ; Mukherjee R. et coll., *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, **51** (1994) 157-166 ; Fajas L. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 18779-18789 ; Mukherjee R. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 8071-8076; Schmidt A. et coll., *Mol. Endocrinol.* **6** (1992) 1634-1641. Le

30 promoteur du PPAR γ a en outre été récemment cloné, comme le décrit la demande WO99/05161.

Dans un mode préféré de l'invention, l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR humain, en particulier un PPAR α ou un PPAR γ . Les résultats présentés dans les exemples montrent en effet que l'utilisation de ces molécules assure au système de l'invention des niveaux de régulation et d'expression importants, notamment dans les cellules musculaires.

Selon un premier mode de mise en œuvre, il s'agit d'un PPAR α ou un PPAR γ dans sa forme native, c'est-à-dire sans modification de structure primaire par rapport à la molécule naturelle.

Selon un autre mode de réalisation, il s'agit d'un PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.

A cet égard, la présente invention décrit et a également pour objet tout PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand. Plus particulièrement, il s'agit d'un PPAR α ou un PPAR γ , encore plus préférentiellement d'un PPAR γ . De préférence, les PPAR modifiés selon l'invention comprennent de 2 à 5 sites de liaison au ligand, plus préférentiellement de 2 à 4 sites de liaison. Il s'agit plus particulièrement de PPAR comportant 2 à 5 copies des domaines E et F impliqués dans la liaison au ligand. Les protéines PPAR renferment différents domaines : le domaine N-terminal A/B qui contient une région transactivatrice non dépendante du ligand, le domaine C qui est le domaine de liaison à l'ADN (DBD), le domaine D qui est une région charnière, et les domaines E/F qui contiennent une région transactivatrice dépendante du ligand. Les domaines E/F sont également appelés domaine de liaison du ligand (LBD) (voir notamment Schoonjans K. et coll., *Biochim. Biophys. Acta*, **1302** (1996) 93-109). Les limites des domaines E/F varient d'un PPAR à l'autre. A titre d'exemple, pour l'isoforme PPAR γ 2 humaine utilisée, le domaine E/F s'étend de l'acide aminé 284 à l'acide aminé 505. La présente invention montre maintenant qu'il est possible de construire des PPAR modifiés comprenant plusieurs domaines E et F répétés, et que ces PPAR modifiés sont fonctionnels et possèdent des propriétés améliorées d'inductibilité par les ligands des PPAR. De telles constructions représentent donc un mode de réalisation et un objet particulier de la présente invention.

Un exemple typique de PPAR modifié selon l'invention est un PPAR_γ comportant 2 sites de liaison au ligand (c'est-à-dire deux domaines E et F). La séquence protéique de PPAR_γ2_γ2 est représentée sur la séquence SEQ ID NO: 24.

5

SEQ ID NO :24

10

15

20

```

MGETLGDSPI DPESDSFTDTLSANISQEMTMVDTEMPFWPTNFGISSVDLSVMEDHSHSFDI
KPFTTVD FSSISTPHYEDIPFTRTDPVVADYKYDLKLQEYQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYN
KPHEEPSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLKL IYDRCDLNCRIHKKS
SYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIF
QGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLLKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLI SEG
QGFMTREFLKSLRKPF GDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIILSGDRPGLLN VKPI
EDIQDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL
LQEIIYKDLYAWAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGC
QFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLLKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLI SEGQGF
MTREFLKSLRKPF GDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIILSGDRPGLLN VKPIEDI
QDNLLQALELQLKLNHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPLLQE
IYKDL Y

```

25

L'invention concerne aussi tout variant de la séquence SEQ ID NO: 24 conservant une activité de type PPAR (la capacité d'activer, en présence d'un ligand de PPAR tel que BRL49653, un promoteur comportant une séquence PPRE). Les variants s'entendent de tout mutant, délétant, et/ou polypeptide comportant un ou plusieurs résidus supplémentaires. Préférentiellement, un variant conservant 80% au moins des résidus de la séquence ID NO: 24.

30

35

En outre, l'invention concerne aussi tout acide nucléique codant pour un tel PPAR modifié. Il peut s'agir d'un ADN (notamment un ADNc ou un ADN synthétique ou semi-synthétique) ou d'un ARN. Cet ADN peut être construit selon les méthodes conventionnelles de biologie moléculaire connues de l'homme du métier (synthèse, ligations, criblage de banques, etc.). Il s'agit avantageusement de tout acide nucléique comprenant une séquence codant un polypeptide de séquence SEQ ID NO:24, ou hybridant avec une séquence codant un polypeptide de SEQ ID NO: 24, et codant un polypeptide à activité de type PPAR. En outre, cet ADN peut comprendre un promoteur et/ou un terminateur transcriptionnel, par exemple.

Le second promoteur transcriptionnel, contrôlant l'expression de l'acide nucléique codant le PPAR, peut être tout promoteur fort ou faible, ubiquitaire ou sélectif, constitutif ou régulé, fonctionnel dans les cellules mammifères, en particulier dans les cellules humaines. Il peut s'agir d'un promoteur cellulaire domestique (i.e., d'un gène mammifère, en particulier humain), d'un promoteur viral, bactérien, d'insecte, de plante, naturel ou synthétique, simple ou complexe, etc. Des exemples de promoteurs appropriés pour cet élément (b) sont notamment des promoteurs viraux (promoteur immédiat du virus SV40, promoteur immédiat du virus CMV, LTR de rétrovirus, promoteur TK du virus de l'herpès) ou cellulaires (promoteur PGK, albumine, EF1 α , ou de gènes fortement exprimés dans le muscle comme : promoteur du gène de la créatine kinase musculaire (MCK), promoteurs des gènes des différentes isoformes d'actine du muscle squelettique, promoteur du gène de la desmine, promoteur du gène de la vimentine, promoteurs des gènes de chaîne légère ou chaîne lourde de la myosine). Par ailleurs, le promoteur peut être modifié par introduction d'une ou plusieurs régions enhanceur, telle que la région enhanceur de l'intron 2 du gène de la globine bêta, enhanceur du gène très précoce du virus CMV, enhanceur de EF1 α , de région(s) silencer, de régions conférant une spécificité tissulaire (par exemple des régions isolées à partir des promoteurs tissus spécifiques comme : promoteur du gène de la créatine kinase musculaire (MCK), promoteurs des gènes des différentes isoformes d'actine du muscle squelettique, promoteur du gène de la desmine, promoteur du gène de la vimentine, promoteurs des gènes de chaîne légère ou chaîne lourde de la myosine) ou un caractère régulable, ou par délétion de régions non essentielles à l'activité, par exemple. De tels promoteurs peuvent être utilisés pour exprimer le RXR, compris dans l'élément (d).

Des exemples préférés de second promoteur sont les promoteurs viraux, notamment le promoteur précoce du virus SV40 et le promoteur immédiat du CMV, ou des dérivés de ceux-ci.

Par ailleurs, dans un mode particulier de mise en œuvre, lorsque les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), sont assemblés dans une même

construction génétique, le second promoteur transcriptionnel (de l'élément (b)) et le promoteur inductible de l'élément (a), et éventuellement le promoteur de l'élément (d) peuvent être groupés pour ne former qu'une région promotrice commune, notamment bidirectionnelle, comme il sera expliqué en détail dans la
5 suite du texte.

A cet effet, un autre objet de la présente invention réside dans un vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b), et éventuellement un élément (d), tels que définis ci-avant.

Selon une première variante de l'invention, les éléments (a) et (b), et
10 éventuellement (d), sont dans la même orientation dans le vecteur. Une telle variante est illustrée par exemple par le plasmide SV-g2-J10-C-pGL3 (figure 17).

Selon une autre variante de l'invention, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), sont en orientation opposée dans le vecteur. Une telle variante est illustrée par exemple par les plasmides représentés sur les figures
15 16, 18 et 19. Plus préférentiellement, dans cette variante de réalisation, le promoteur inductible de l'élément (a) et le promoteur transcriptionnel de l'élément (b) sont assemblés dans le vecteur pour former un promoteur bidirectionnel régulable. Un tel mode de mise en œuvre est illustré par exemple par les plasmides représentés sur les figures 18 et 19.

A cet égard, un objet particulier de l'invention réside dans un vecteur
20 caractérisé en ce qu'il comprend, dans le sens 5'→3', un premier acide nucléique codant un PPAR, un premier promoteur transcriptionnel minimal contrôlant l'expression dudit premier acide nucléique, un ou plusieurs élément(s) de réponse à un PPAR, un deuxième promoteur transcriptionnel minimal et,
25 sous le contrôle dudit deuxième promoteur transcriptionnel minimal, un deuxième acide nucléique codant un produit d'intérêt.

Ce type de construction est avantageux puisqu'il permet la co-expression des deux acides nucléiques dans le même plasmide, et l'amplification de cette expression par la régulation des deux acides nucléiques par les PPAR et leurs
30 ligands.

L'expression de l'acide nucléique d'intérêt dans les compositions de l'invention est activée généralement en présence d'un ligand de PPAR (élément (c)). A cet égard, selon le PPAR utilisé, différents types de ligands peuvent être utilisés, naturels ou synthétiques.

5 Ainsi, les ligands activateurs des PPAR α sont par exemple les fibrates tels que l'acide fibrique et ses analogues. Comme analogues de l'acide fibrique on peut mentionner notamment le gemfibrozyl (Atherosclerosis 114(1) (1995) 61), le bezafibrate (Hepatology 21 (1995) 1025), le ciprofibrate (BCE&M 9(4) (1995) 825), le clofibrate (Drug Safety 11 (1994) 301), le fénofibrate (Fenofibrate
10 Monograph, Oxford Clinical Communications, 1995), le clinofibrate (Kidney International. 44(6) (1993) 1352), l'acide pirinixique (Wy-14,643) ou l'acide 5,8,11,14-eicosatétranoïque (ETYA). Ces différents composés sont compatibles avec une utilisation biologique et/ou pharmacologique in vitro ou in vivo.

 Les ligands activateurs des PPAR γ peuvent être choisis parmi les ligands
15 naturels et synthétiques. Comme ligands naturels, on peut mentionner les acides gras et les eicosanoïdes (par exemple l'acide linoléique, l'acide linolénique, le 9-HODE, le 5-HODE) et comme ligands synthétiques on peut mentionner les thiazolidinediones, telles que notamment la rosiglitazone (BRL49653), la pioglitazone ou la troglitazone (voir par exemple Krey G. et coll.,
20 *Mol. Endocrinol.*, 11 (1997) 779-791 ou Kliewer S. et Willson T., *Curr. Opin. in Gen. Dev.* 8 (1998) 576-581) ou le composé RG12525.

 Par ailleurs, les compositions selon l'invention peuvent comporter plusieurs activateurs de PPAR en association, et en particulier un fibrate ou un analogue de fibrate associé à un rétinoïde.

25 L'invention a également pour objet l'utilisation d'une composition ou d'un vecteur tels que définis ci-avant pour exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ex vivo ou in vitro.

 A cet égard, l'acide nucléique peut être tout acide nucléique (ADN, ARN) codant pour un produit d'intérêt (ARN, protéine, polypeptide, peptide, etc.). Il
30 peut s'agir d'un produit d'intérêt agroalimentaire, thérapeutique, vaccinal, d'un marqueur, etc.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'une composition ou d'un vecteur tels que définis ci-avant pour la préparation d'un produit destiné à exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule in vivo.

5 L'invention a encore pour objet un procédé pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule, comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une composition ou un vecteur tels que définis ci-avant.

Pour un usage in vitro ou ex vivo, les cellules peuvent être mises en contact avec les compositions ou vecteurs de l'invention selon différents protocoles. Ainsi, les cellules en culture peuvent être incubées directement avec
10 les éléments (a), (b) et (c), et éventuellement (d), de l'invention, par exemple avec un vecteur comportant les éléments (a) et (b) et en présence du ligand (c). De manière alternative, les cellules peuvent être incubées dans un premier temps avec les éléments (a) et (b), et éventuellement (d) (notamment assemblés dans un même vecteur) puis, dans un deuxième temps (après
15 culture et éventuellement sélection des cellules modifiées), l'élément (c) peut être ajouté. Ce dernier type de protocole permet par exemple de découpler la phase de culture (ou d'expansion des cellules) de la phase d'expression de l'acide nucléique. Ces expériences peuvent être réalisées dans tout dispositif et milieu approprié, de préférence en plaque, boîte, flasque, en condition stérile.
20 Les quantités de cellules, vecteur et ligand peuvent être aisément adaptées par l'homme du métier, sur la base des informations fournies dans les exemples et de ses connaissances générales.

Pour une utilisation in vivo, les cellules (ou organes, tissu, etc.) sont mises en contact par administration des éléments (a), (b) et (c), et éventuellement (d),
25 in vivo, de manière simultanée, séparée ou espacée dans le temps. A cet effet, les éléments (a) et (b), et éventuellement (d), éventuellement sous forme d'une construction génétique unique, sont généralement administrés par voie parentérale, en particulier intramusculaire, intraveineuse, sous-cutanée, intradermique, intratumorale ou stéréotaxique. Le choix du mode
30 d'administration peut être guidé par l'application envisagée, le tissu ciblé et/ou le type de produit d'intérêt codé par le transgène. Pour cette administration, les

compositions de l'invention peuvent comprendre tout agent favorisant la transfection cellulaire (polymère cationique, lipide, etc.). Dans un mode particulier, les compositions sont administrées par voie intramusculaire, et les constructions génétiques sont utilisées sous forme d'acide nucléique "nu", c'est-à-dire sans agent de transfection ajouté.

De même, lorsque les éléments (a) et (b), et éventuellement (d) sont introduits au moyen de vecteurs viraux, aucun agent de transfection supplémentaire n'est nécessaire.

Comme il est illustré dans les exemples, le ligand (c) peut être administré avant, simultanément, ou après les éléments (a) et (b), et éventuellement (d).

A cet égard, l'administration du ligand peut être réalisée par voie orale, anale, intraveineuse, intrapéritonéale ou intramusculaire, par exemple.

Les doses utilisées peuvent être adaptées par l'homme du métier, sur la base des données in vivo publiées dans la littérature. Ainsi par exemple, pour une forme non soluble dans l'eau, des doses typiques de ligand tel que BRL 49653 sont comprises entre 5 et 50 mg/kg, par exemple 30 mg/kg, permettant d'obtenir une concentration plasmatique proche de 15 µg/ml environ, au moins. Pour une forme hydrosoluble de ligand, dont la biodisponibilité est plus grande (par exemple un sel de maleate du BRL49653) les doses typiques sont plus faibles, généralement inférieures à 5 mg/kg, par exemple de 0,01 à 1 mg/kg. Ces doses peuvent bien évidemment être adaptées par l'homme du métier en fonction des constructions utilisées, des ligands utilisés, et des applications et effets recherchés. D'une manière générale, les résultats présentés dans les exemples montrent avantageusement que les compositions de l'invention permettent d'obtenir in vivo une expression forte et régulée, à des doses de ligand inférieures à celles utilisées habituellement. En outre, bien que des administrations répétées de ligand peuvent être réalisées, les résultats présentés montrent aussi que l'expression est forte après une prise unique de ligand.

De manière générale, les doses de vecteur utilisées peuvent varier entre 0,01 et 1000 µg, ou plus, selon les applications recherchées.

L'invention peut être utilisée pour exprimer un gène dans différents types de cellules, de tissus ou d'organes, in vitro, ex vivo ou in vivo. En particulier, il peut s'agir d'une cellule, d'un tissu ou d'un organe mammifère, de préférence humain. A titre illustratif, on peut citer les cellules musculaires (ou un muscle),
5 hépatiques (ou le foie), cardiaques (ou le cœur, la paroi artérielle ou vasculaire), nerveuses (ou le cerveau, la moelle, etc) ou tumorales (ou une tumeur).

Préférentiellement, les constructions, compositions et procédé de l'invention sont utilisés pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule musculaire (ou un muscle) in vitro, ex vivo ou in vivo. Les résultats
10 présentés dans les exemples illustrent plus particulièrement les avantages de l'invention in vivo ou in vitro dans ce type de cellules.

L'invention concerne aussi toute cellule modifiée par mise en contact avec une composition ou un vecteur tels que définis ci-avant.

L'invention concerne également l'utilisation d'une composition, d'un vecteur
15 ou d'une cellule tels que définis ci-avant, dans lesquels l'acide nucléique d'intérêt est un gène reporter (tel que par exemple la luciférase ou la phosphatase alcaline sécrétée) pour le criblage in vitro, ex vivo ou in vivo (en particulier dans les cellules musculaires ou un muscle) de ligands des PPAR. A cet égard, l'invention décrit aussi un procédé d'identification de ligands des
20 PPAR comprenant la mise en contact d'une cellule telle que définie ci-avant avec une molécule (ou composition) test, et la mise en évidence d'une expression de l'acide nucléique d'intérêt (celui-ci étant préférentiellement un gène reporter). L'expression peut en outre être comparée à celle observée en l'absence de composé test ou en présence d'un ligand de référence, afin
25 d'évaluer l'activité du composé testé.

L'invention concerne également l'utilisation d'une composition ou d'un vecteur tels que définis ci-avant, pour la construction d'animaux transgéniques, notamment de mammifères non-humains, utiles pour des études précliniques, ou pour des études de biodisponibilité, de marquage, etc.

30 La présente invention sera décrite plus en détails à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique du plasmide FTKpGL3.

5

Figure 2 : Représentation schématique du plasmide Jx3S-TK-pGL3.

Figure 3 : Représentation schématique du plasmide Jx3AS-TK-pGL3.

10

Figure 4 : Représentation schématique du plasmide DR1x3S-TK-pGL3.

Figure 5 : Représentation schématique du plasmide DR1x3AS-TK-pGL3.

15

Figure 6 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide FTKpGL3 (a), ou Jx3S-TK-pGL3 (b), ou Jx3AS-TK-pGL3 (c), ou DR1x3S-TK-pGL3 (d), ou DR1x3AS-TK-pGL3 (e), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPARg2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

2025

Figure 7 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide FTKpGL3 (a), ou Jx3S-TK-pGL3 (b), ou Jx3AS-TK-pGL3 (c), ou DR1x3S-TK-pGL3 (d), ou DR1x3AS-TK-pGL3 (e), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPARa(Koz), et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

30

Figure 8 : Représentation schématique du plasmide Jx5AS-CMV-pGL3.

Figure 9 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont
5 cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide Jx5AS-TK-pGL3 (a), ou Jx5AS-CMV-pGL3 (b), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPARg2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

10

Figure 10 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont
cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide JxnAS-TK-pGL3, (ii) 10 ng de
plasmide pSG5-hPPARg2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de
15 chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 11 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont
20 cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide JxnAS-CMV-pGL3, (ii) 10 ng (a) ou 50 ng (b) de plasmide pSG5-hPPARg2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

25 **Figure 12 :** Représentation schématique du plasmide pSG5-hPPARg2g2.

Figure 13 : Comparaison des régulateurs transcriptionnels hPPARg2 et hPPARg2g2. Des myoblastes de souris (C2C12) sont cotransfectés avec : (i) 10
ng de plasmide Jx10AS-CMV-pGL3, (ii) des quantités croissantes de plasmide
30 pSG5-hPPARg2 (a) ou pSG5-hPPARg2g2 (b), et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité du promoteur inductible représente l'activité luciférase de

Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.
(c) : facteurs d'induction par le BRL49653 obtenus avec le plasmide pSG5-hPPARg2 ou le plasmide pSG5-hPPARg2g2. Ce facteur d'induction est calculé en divisant l'activité en présence de BRL49653 par l'activité en présence de DMSO.

Figure 14 : Représentation schématique du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3.

Figure 15 : Activités des promoteurs inductibles évaluées en transfections transitoires in vitro dans des myoblastes de souris (C2C12). Les cellules sont cotransfectées avec : (i) 10 ng de plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 (a), ou Jx10AS-CMV-EF-pGL3 (b), (ii) des quantités croissantes de plasmide pSG5-hPPARg2g2, et (iii) 20 ng de plasmide pRL-null. L'activité de chaque promoteur inductible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 16 : Représentation schématique du plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2.

Figure 17 : Représentation schématique du plasmide SV-g2-J10-C-pGL3.

Figure 18 : Représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3.

Figure 19 : Représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3.

Figure 20 : Comparaison des différentes versions du système inductible in vitro. Des myoblastes de souris (C2C12) sont transfectés avec, pour chaque version du système, le même nombre de moles de cassettes d'expression inductible. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'activité du promoteur hCMV-IE, obtenue en utilisant le plasmide pCMV-leadTK. Les facteurs d'induction par le

BRL49653 sont calculés en divisant l'activité en présence de BRL49653 par l'activité en présence de DMSO. 1 = pSG5-hPPARg2 + Jx5AS-TK-pGL3 ; 2 = Jx5AS-TK-luc-hPPARg2 ; 3 = pSG5-hPPARg2g2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 4 = pSG5-hPPARg2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 5 = SV-g2-J10-C-pGL3 ; 6 = hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 ; 7 = hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 ; 8 = hPPARg2-CMV-Jx15AS-CMV-pGL3 ; 9 = hPPARg2-CMV-Jx20AS-CMV-pGL3.

Figure 21 : Comparaison in vitro des ligands BRL49653 et RG12525. Des myoblastes de souris (C2C12) sont transfectés avec : (i) 10 ng de plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 dont la cassette d'expression est présentée en (a) et (ii) 10 ng de plasmide pRL-null. (b) L'activité du promoteur inducible représente l'activité luciférase de Photinus pyralis normalisée par l'activité de la luciférase de Renilla reniformis.

Figure 22 : Comparaison de différentes versions du système inducible in vivo. Des souris C57Bl/6 (6 souris par groupe) sont injectées en bilatéral, dans le tibial cranial, avec, pour chaque version du système, le même nombre de moles de cassettes d'expression inducible. Un électrotransfert est alors appliqué sur chaque muscle. Les animaux traités reçoivent chaque jour, par gavage, 30 mg / kg de BRL49653. Quatre jours après l'injection d'ADN, les animaux sont sacrifiés et les muscles sont prélevés pour mesurer l'activité luciférase. 1 = pCMV-leadTK ; 2 = pSG5-hPPARg2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 3 = pSG5-hPPARg2g2 + Jx10AS-CMV-pGL3 ; 4 = hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3.

Figure 23 : Comparaison, in vivo, de différents protocoles d'induction au BRL49653. Des souris C57Bl/6 (6 souris par groupe) sont injectées en bilatéral, dans le tibial cranial, avec 10 µg d'ADN contenant 1 µg du plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 dont la cassette d'expression est présentée en (a). Les activités obtenues avec les différents protocoles d'induction sont rassemblées dans le panneau (b).

Figure 24 : Représentation schématique du plasmide pRDA02.

Figure 25 : Cinétiques d'induction obtenues in vivo avec le système inductible.

(A) Dix souris C57Bl/6 sont injectées en bilatéral, dans le tibia cranial, avec un mélange d'ADN contenant 3 mg de plasmide pRDA02 et 3 mg de plasmide pSG5-hPPAR γ 2. Un électrotransfert est alors appliqué sur chaque muscle. Quatre jours, puis 39 jours après l'injection d'ADN, les animaux sont traités, par gavage, avec 30 mg/kg de BRL49653. A différents temps, des prises de sang sur héparine sont réalisées, et l'activité enzymatique de la phosphatase alcaline sécrétée (hSeAP) est mesurée dans le plasma, en utilisant le Kit Phospha-Light™ (Tropix, PE Biosystems, Foster City, CA). (B) Des souris C57Bl/6 (2 groupes de 10 souris) sont injectées en bilatéral, dans le tibia cranial, avec un mélange d'ADN contenant 3 mg de plasmide pRDA02 et 3 mg de plasmide pSG5-hPPAR γ 2. Un électrotransfert est alors appliqué sur chaque muscle. Quatre jours après l'injection d'ADN, les animaux reçoivent, par gavage, soit une seule dose de BRL49653 (30 mg/kg), soit une dose par jour (30 mg/kg) durant 5 jours. A différents temps, des prises de sang sur héparine sont réalisées, et l'activité enzymatique de la hSeAP est mesurée dans le plasma, en utilisant le Kit "Phospha-Light" (Tropix). Les résultats présentés (facteurs d'induction) correspondent au rapport entre l'activité de la hSeAP mesurée au jour d'intérêt et celle obtenue à J4.

Figure 26 : Comparaison, *in vivo*, de différents ligands de PPAR γ , et étude de l'effet dose de l'un d'eux. Des souris C57Bl/6 (5 souris par groupe) sont injectées en bilatéral, dans le tibia cranial, avec un mélange d'ADN contenant 5 mg de plasmide pRDA02 et 5 mg de plasmide pSG5-hPPAR γ 2. Un électrotransfert est alors appliqué sur chaque muscle. Six jours (A) ou 10 jours (B) après l'injection d'ADN, les animaux sont traités, par gavage, soit avec différents ligands de PPAR γ (A ; BRL49653, Actos™ (Takeda Pharmaceuticals) et Avandia™ (SmithKline Beecham)), soit avec différentes doses de BRL49653 (B). A différents temps, des prises de sang sur héparine sont réalisées, et

l'activité enzymatique de la hSeAP est mesurée dans le plasma, en utilisant le Kit "Phospha-Light" (Tropix). Les résultats présentés (facteurs d'induction) correspondent au rapport entre l'activité de la hSeAP mesurée au jour d'intérêt et celle obtenue a J6 (A) ou J10 (B).

5

Figure 27 : Représentation schématique du plasmide Jx10AS-CMV-VEGF_A165.

MATERIELS ET METHODES

10 Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose, la purification de fragments d'ADN par électroélution, la précipitation d'ADN plasmidique en milieu salin par l'éthanol ou l'isopropanol, la
15 transformation dans Escherichia coli sont bien connues de l'homme de l'art et sont abondamment décrites dans la littérature (Sambrook et coll., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989).

20 Le plasmide pGL3-Basic, utilisé pour les clonages des différentes régions promotrices, ainsi que le plasmide pRL-null, sont d'origine commerciale (Promega Corporation). Les plasmides pSG5 (Stratagene), pBluescript II SK+ (Stratagene) et pSL301 (Invitrogen Corporation) sont également d'origine commerciale. Les constructions des plasmides d'expression pSG5-hPPARg2
25 (Fajas L. et coll., *J. Biol. Chem.*, **272** (1997) 18779-18789) et pSG5-hPPARa(Koz) (Gervois P. et coll. *Mol. Endocrinol.*, **13** (1999) 400-409) ont été précédemment décrites.

La construction du plasmide pCMV-leadTK a également été décrite
30 précédemment dans la demande de brevet FR 98/ 120000 du 25/09/98 et dans la demande de brevet US SN 60/123,298 (provisional application).

Il est rappelé que ce plasmide est construit de la manière suivante. Le vecteur d'expression pCGN précédemment décrit par Tanaka et coll. (*Cell*, 60 (1990) 375-386) contient le promoteur CMV (-522/+72) fusionné au « leader » du gène tk de HSV (+51/+101) en amont d'une séquence codant pour l'épitope de l'hémagglutinine. Le plasmide pGCN (10ng) a été utilisé comme matrice pour une amplification ACP. Les amorces qui ont été utilisées sont les suivantes :

- Amorce 6718 (5' CCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG 3') (SEQ ID NO : 26), cette amorce s'hybride avec le promoteur CMV en position - 522 (8 nucléotides en aval du site EcoRI de pCGN).
- 10 - Amorce 6719 (5' **G**GGACGCGCTTCTACAAGGCGCTGGCCGAA 3') (SEQ ID NO : 27), cette amorce s'hybride jusqu'en position 101 du « leader » tk . Le premier nucléotide G en gras est destiné à restaurer le site NcoI de pGL3-Basic comme sera explicité ci-dessous.

Le fragment d'ACP ainsi obtenu est purifié puis phosphorylé à l'aide de la polynucléotide kinase du phage T4 (New England Biolabs). Parallèlement, le vecteur pGL3-Basic (Proméga) a été linéarisé par NcoI, purifié puis traité par la Klenow ADN polymérase (Boehringer Mannheim) afin de remplir le site NcoI. Ce vecteur est ensuite déphosphorylé à l'aide de la phosphatase alcaline (Boehringer Mannheim) puis utilisé pour l'insertion du fragment ACP phosphorylé.

20 Ainsi, la guanosine (G) de l'amorce 6719 permet de restaurer le site NcoI uniquement lorsque le fragment CMV-leader tk est orienté avec la partie 5' (amorce 6718, position -522 du CMV) en aval du site HindIII de pGL3-Basic et son extrémité 3' (amorce 6719, leader tk) est ligaturée au site NcoI de pGL3-Basic (premier ATG de la luciférase). Le plasmide obtenu est désigné pCMV-leadTK.

25 L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique d'ACP (Amplification en Chaîne par la Polymerase) peut être effectuée en utilisant un DNA thermal cycler™ (Perkin Elmer Cetus) selon les recommandations du fabricant.

L'électroporation d'ADN plasmidique dans des cellules d'Escherichia coli peut être réalisée à l'aide d'un électroporateur (Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par le
5 méthode développée par Sanger et coll. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74 (1977) 5463-5467) en utilisant le kit distribué par Applied Biosystems selon les recommandations du fabricant.

Les myoblastes murins C2C12 sont cultivés en milieu DMEM™ (Life Technologies Inc.) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF). Les
10 cultures sont réalisées dans une étuve à 37°C, en atmosphère humide et sous une pression partielle en CO₂ de 5%.

Les transfections sont réalisées en plaques 24 puits et chaque transfection est effectuée trois fois. Vingt quatre heures avant la transfection, les cellules sont ensemencées à 3x10⁴ cellules par puits en milieu DMEM™. Pour chaque
15 puits, 500 ng d'ADN plasmidique (plasmides d'intérêt et pBluescript II SK+ pour compléter à 500 ng) sont mélangés au lipide cationique RPR120535 B (WO97/18185) à raison de 6 nmoles de lipide par µg d'ADN dans du milieu DMEM™ (20 µl final) comprenant 150 mM de NaCl et 50 mM de bicarbonate. Après 20 minutes à température ambiante, les 20 µl du mélange ADN/lipide sont
20 mis en contact avec les cellules, en absence de SVF, durant 2 heures. Le milieu de culture est alors supplémenté en SVF ou en ULTROSER™ (BioSeptra Inc.) de manière à obtenir une concentration finale de respectivement 10% ou 2%. Les ligands des PPAR, dissous dans du DMSO, sont ajoutés dans le milieu de culture en même temps que le SVF ou l'ULTROSER™. Quarante huit heures
25 après la transfection, le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS (Life Technologies Inc.). L'activité de la luciférase de Photinus pyralis et l'activité de la luciférase de Renilla reniformis sont alors déterminées à l'aide du kit Dual-Luciferase Reporter Assay System™ (Promega Corporation) selon les recommandations du fournisseur.

30 Les expériences de transfert de gène in vivo sont réalisées sur des souris femelles C57Bl/6 âgées de 6 semaines. Les animaux sont anesthésiés avec

250 µl d'un mélange kétamine (Rhône Mérieux, 10 mg/ml final) / Xylazine (Bayer Pharma, 0,3 mg/ml final) par voie intrapéritonéale. Une injection d'une quantité totale de 10 µg d'ADN est alors réalisée dans chaque muscle tibial cranial. Chaque patte est ensuite soumise à un champ électrique (fréquence de 1 Hz; 4
5 pulses de 20 ms à 250 V/cm). Durant toute la durée de l'expérience, les animaux reçoivent chaque matin, par gavage, soit 30 mg/kg de BRL49653 (SmithKline Beecham) en carboxycellulose 1% (poids/volume), soit la carboxycellulose 1% seule. Quatre jours après le transfert de gène, les animaux sont sacrifiés et les muscles prélevés en tampon de lyse PLB™ (Promega
10 Corporation) dans des tubes Lysing Matrix™ (BIO 101, Inc.). Le broyage des muscles, qui permet d'extraire la luciférase, est réalisé à l'aide de l'appareil FastPrep™ (BIO 101, Inc.) durant 25 secondes à 6,5 m/s. L'activité de la luciférase de Photinus pyralis est alors déterminée à l'aide du kit Luciferase Assay System™ (Promega Corporation) selon les recommandations du
15 fournisseur.

EXEMPLES

**EXEMPLE 1 : Construction de promoteurs inductibles par les PPAR et de
20 plasmides d'expression les contenant.**

1.1. Plasmide FTKpGL3.

Un fragment d'ADN, correspondant à une partie du promoteur du gène TK
25 du virus herpès simplex de type 1 (HSV-1), compris entre les positions -105 et +56 par rapport au site d'initiation de la transcription, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pBLCAT2 (Luckow B. et Schutz G., *Nucleic Acids Res.*, 15 (1987) 5490) comme matrice et les oligonucléotides 5' CGA CTC TAG AAG ATC TTG CCC CGC CCA GCG 3' (SEQ ID NO: 28) et 5' TCG CCA AGC TTC
30 TCG TGA TCT GCG GCA 3' (SEQ ID NO: 2) comme amorces. Ce fragment a été digéré par BglII et HindIII puis a été cloné dans le plasmide pGL3-Basic

préalablement digéré par BglII et HindIII pour obtenir le plasmide FTKpGL3. Une représentation schématique de ce plasmide est présentée dans la figure 1.

5 1.2. Plasmides JxnS-TK-pGL3.

Un fragment d'ADN, contenant un ou plusieurs (n) sites J du promoteur du gène de l'ApoA-II humaine, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 (Vu-Dac N. et coll., *J. Clin. Invest.*, **96** (1995) 741-750) comme
10 matrice et les oligonucléotides 3RDA37 (5' ACG TGT CGA CAC TAG TGG CTA GAG GAT CTC TAC CAG G 3' ; SEQ ID NO: 3) et 4RDA48 (5' CGA TGG TAC CCT CGA GCA ATG TGC TAG CGA GAT CCT TCA ACC TTT ACC 3' ; SEQ ID NO: 4) comme amorces. Ce fragment a été digéré par XhoI et SpeI puis a été cloné dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI, dans
15 le sens de la transcription du promoteur minimal TK (S), pour obtenir les plasmides Jx1S-TK-pGL3, Jx2S-TK-pGL3 et Jx3S-TK-pGL3, selon le nombre de sites J présents. Une représentation schématique du plasmide Jx3S-TK-pGL3 est présentée dans la figure 2.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 et
20 les oligonucléotides 3RDA37 et 4RDA48 comme amorces, digéré par XhoI et SpeI, a également été cloné dans le plasmide Jx3S-TK-pGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides Jx4S-TK-pGL3, Jx5S-TK-pGL3 et Jx6S-TK-pGL3, selon le nombre de sites J présents.

25

1.3. Plasmides JxnAS-TK-pGL3.

Les plasmides JxnAS-TK-pGL3 diffèrent des plasmides JxnS-TK-pGL3 par l'orientation des sites J présents dans le promoteur inductible. Un fragment
30 d'ADN, contenant un ou plusieurs sites J du promoteur du gène de l'ApoA-II humaine, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 comme

matrice et les oligonucléotides 3RDA37 et 4RDA48 comme amorces. Ce fragment a été digéré par Sall et NheI puis a été cloné, dans le sens inverse de la transcription du promoteur minimal TK (AS), dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides Jx1AS-TK-pGL3, Jx2AS-TK-pGL3 et Jx3AS-TK-pGL3, selon le nombre de sites J présents. Une représentation schématique du plasmide Jx3AS-TK-pGL3 est présentée dans la figure 3.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant le plasmide J3TKpGL3 et les oligonucléotides 3RDA37 et 4RDA48 comme amorces, digéré par KpnI et SpeI, a également été cloné dans l'orientation antisens (AS) dans le plasmide Jx3AS-TK-pGL3 préalablement digéré par KpnI et NheI pour obtenir les plasmides Jx4AS-TK-pGL3 et Jx5AS-TK-pGL3 selon le nombre de sites J présents.

1.4. Plasmides DR1xnS-TK-pGL3.

Ces plasmides contiennent, comme élément de réponse aux PPAR (PPRE), une séquence consensus (AGGTCA A AGGTCA , SEQ ID NO: 5) appelée DR1 consensus. Un fragment d'ADN, contenant un ou plusieurs sites DR1 consensus, a été amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 (5' ACG TGT CGA CAC TAG TCA AAA CTA GGT CAA AGG TCA CGG AAA ACT AGG TCA AAG GTC ACG GAA AAC TAG 3' ; SEQ ID NO: 6) et 2RDA64 (5' CGA TGG TAC CCT CGA GCA ATG TGC TAG CCG TGA CCT TTG ACC TAG TTT TCC GTG ACC TTT GAC C 3' ; SEQ ID NO: 7) comme amorces. Ce fragment a été digéré par XhoI et SpeI puis a été cloné, dans l'orientation sens, dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x2S-TK-pGL3 et DR1x3S-TK-pGL3, selon le nombre de sites DR1 consensus présents. Une représentation schématique du plasmide DR1x3S-TK-pGL3 est présentée dans la figure 4.

Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 et 2RDA64 comme amorces, digéré par XhoI et SpeI, a également été cloné dans le plasmide DR1x3S-TK-pGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x5S-TK-pGL3, DR1x6S-TK-pGL3 et
5 DR1x7S-TK-pGL3, selon le nombre de sites DR1 consensus présents.

1.5. Plasmides DR1xnAS-TK-pGL3.

10 Les plasmides DR1xnAS-TK-pGL3 diffèrent des plasmides DR1xnS-TK-pGL3 par l'orientation des sites DR1 consensus présents dans le promoteur inductible. Un fragment d'ADN, contenant une ou plusieurs séquences DR1 consensus, a été amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 et 2RDA64 comme amorces. Ce fragment a été digéré par Sall et NheI puis a été
15 cloné, dans l'orientation antisens, dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par XhoI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x2AS-TK-pGL3 et DR1x3AS-TK-pGL3, selon le nombre de sites DR1 consensus présents. Une représentation schématique du plasmide DR1x3AS-TK-pGL3 est présentée dans la figure 5.

20 Le fragment d'ADN, amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 1RDA69 et 2RDA64 comme amorces, digéré par KpnI et SpeI, a également été cloné dans le plasmide DR1x3AS-TK-pGL3 préalablement digéré par KpnI et NheI pour obtenir les plasmides DR1x5AS-TK-pGL3 et DR1x6AS-TK-pGL3 selon le nombre de sites DR1 consensus présents.

25

EXEMPLE 2 : Spécificité des PPAR pour différents éléments de réponse.

2.1. Système utilisant hPPAR γ 2.

30

L'activité des promoteurs inductibles, en utilisant hPPARg2 comme régulateur transcriptionnel, a été évaluée en transfection transitoire dans des myoblastes de souris (figure 6). Les résultats montrent que, selon l'élément de réponse utilisé (PPRE), l'induction par le ligand de hPPARg2 (BRL49653) et l'activité finale après activation varient. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant des sites J comme PPRE. De plus, l'orientation du PPRE est également importante. Dans le cas du site J, l'orientation AS est plus favorable (Panneau c).

10

2.2. Système utilisant hPPARa.

Les résultats obtenus avec hPPARa comme régulateur transcriptionnel, sont rassemblés dans la figure 7. Contrairement au hPPARg2, c'est le DR1 consensus qui est le meilleur PPRE pour hPPARa (Panneaux d et e)

Ces résultats montrent donc (1) la fonctionnalité des plasmides de l'invention et (2) que selon le PPAR choisi dans le système inductible, il est important de sélectionner le PPRE le plus adapté au régulateur transcriptionnel. Ce choix peut influencer le facteur d'induction dû à la présence du ligand mais également le niveau d'activité atteint après induction. Il est bien entendu que d'autres PPRE peuvent être utilisés dans le système de l'invention.

EXEMPLE 3 : Construction de promoteurs inductibles par les PPAR contenant un promoteur minimum autre que celui de HSV1-TK comme par exemple le promoteur minimum de hCMV-IE.

3.1. Construction des plasmides contenant le promoteur minimum de hCMV-IE.

30

Un fragment d'ADN, contenant le promoteur minimum de hCMV-IE (de la position -54 à la position +48 par rapport au site d'initiation de la transcription), a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pCMV β (Clontech) comme matrice et les oligonucléotides 5RDA32 (5' ACG TAG ATC TCG GTA GGC GTG TAC GGT GGG AG 3' ; SEQ. ID NO: 8) et 6RDA29 (5' ACG TAA GCT TCT ATG GAG GTC AAA ACA GC 3' ; SEQ ID NO: 9) comme amorces. Ce fragment a été digéré par HindIII et BglII puis a été cloné dans le plasmide FTKpGL3 préalablement digéré par HindIII et BglII pour obtenir le plasmide FCMVpGL3.

Le plasmide Jx5AS-TK-pGL3 a été digéré par BglII et NheI pour isoler le fragment BglII-NheI de 179 pb contenant 5 copies du site J. Ce fragment a été inséré dans le plasmide FCMVpGL3 préalablement digéré par BglII et NheI pour donner le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3. Une représentation schématique du plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 est présentée dans la figure 8.

Le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 a été digéré par SphI et NheI pour isoler le fragment SphI-NheI de 982 pb contenant 5 copies du site J, le promoteur minimum hCMV-IE et la partie 5' du gène codant pour la luciférase. Ce fragment a été inséré dans le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par SphI et SpeI pour donner le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3. Les plasmides Jx15AS-CMV-pGL3 et Jx20AS-CMV-pGL3 ont également été obtenus en suivant la même stratégie.

3.2. Activité des plasmides contenant le promoteur minimum de hCMV-IE.

Une comparaison des promoteurs minimum pouvant être utilisés dans le système inductible a été réalisée en transfection transitoire. Les résultats, rassemblés dans la figure 9, montrent que selon le promoteur minimum, l'activité finale après induction peut varier d'un facteur deux. Ces résultats montrent en particulier que, dans les conditions testées, le promoteur CMV semble donner une activité supérieure. Bien entendu, d'autres promoteurs minimum, comme des promoteurs ne contenant pas de boîte TATA, peuvent être utilisés.

EXEMPLE 4 : Importance du nombre d'éléments de réponse présents dans les promoteurs inductibles .

5

L'optimisation du nombre de PPRE présents dans le promoteur inductible a été étudiée en transfection transitoire. Les résultats, présentés dans la figure 10, montrent que plus le nombre de copies du PPRE est important, plus le facteur d'induction par le ligand et l'activité induite sont élevés. Par contre, si ce nombre est trop important, à la fois le facteur d'induction et l'activité induite diminuent, et ceci quelle que soit la quantité de hPPARg2 présente dans l'essai (figure 11). Le nombre de PPRE optimal semble compris entre 10 et 15.

EXEMPLE 5 : Construction d'un régulateur transcriptionnel fortement inductible par les ligands des PPAR.

5.1. Construction d'un régulateur transcriptionnel comprenant deux copies du domaine de liaison au ligand. Construction du plasmide pSG5-hPPARg2g2.

20

Un fragment d'ADN, noté A, contenant la région de l'ADN complémentaire de hPPARg2 codant pour la partie C-terminale du domaine F, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pSG5-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides 20RDA21 (5' GGT TTG CTG AAT GTG AAG CCC 3' ; SEQ ID NO: 10) et 21RDA42 (5' AGT CTC TAG AGC TAC GCG TAC AAG TCC TTG TAG ATC TCC TGC 3' ; SEQ ID NO: 11) comme amorces. Un fragment d'ADN, noté B, contenant la région de l'ADN complémentaire de hPPARg2 codant pour les domaines E et F, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pSG5-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides 22RDA32 (5' AGT CAC GCG TGG GCG ATC TTG ACA GGA AAG AC 3' ; SEQ ID NO: 12) et 23RDA21 (5' GCC TTT GAG TGA GCT GAT ACC 3' ; SEQ ID NO: 13) comme amorces. Le

30

fragment A, digéré par SacI et MluI et le fragment B, digéré par MluI et XbaI ont été clonés ensemble dans le plasmide pSG5-hPPARg2 préalablement digéré par SacI et XbaI pour obtenir le plasmide pSG5-hPPARg2g2. Ce plasmide, dont une représentation schématique est présentée dans la figure 12, contient un

5 ADN complémentaire qui code pour un régulateur transcriptionnel (noté hPPARg2g2) comprenant deux copies des domaines E et F, c'est à dire deux domaines de liaison au ligand.

La séquence complète du PPAR γ 2 est représentée ci-dessous (SEQ ID NO: 24) :

10 MGETLGDSPI DPESDSFTDTLSANISQEMTMVDTEMPFWPTNFGISSVDLSVMEDHSHSFDI
 KPFTTVDFSSISTPHYEDIPFTRTDPVVADYKYDLKLQEQSAIKVEPASPPYYSEKTQLYN
 KPHEEPSNSLMAIECRVCGDKASGFHYGVHACEGCKGFFRRTIRLKLIDRCDLNCRIHKKS
 RNKCQYCRFQKCLAVGMSHNARFGRMPQAEKEKLLAEISSDIDQLNPESADLRALAKHLYD
 SYIKSFPLTKAKARAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIF
 15 QGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLTKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLI SEG
 QGFMTREFLKSRLKPFPGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIISGDRPGLLNVKPI
 EDIQDNLQALELQKL NHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL
 LQEIYKDLYAWAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGC
 QFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLTKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLI SEGQGF
 20 MTREFLKSRLKPFPGDFMEPKFEFAVKFNALELDDSDLAIFIAVIIISGDRPGLLNVKPIEDI
 QDNLQALELQKL NHPESQLFAKLLQKMTDLRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL LQE
 IYKDLY

La séquence de la partie C-terminale de PPAR γ 2, comprenant les domaines E

25 et F, est la séquence SEQ ID NO : 25 suivante :

MMGEDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTL
 LKYGVHEIIYTMLASLMNKDGVLI SEGQGFMTREFLKSRLKPFPGDFMEPKFEFAVKFNALEL
 DDSDLAIFIAVIIISGDRPGLLNVKPIEDIQDNLQALELQKL NHPESQLFAKLLQKMTD
 30 LRQIVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL LQEIYKDLYAWAILTGKTTDKSPFVIYDMNSLMMG
 EDKIKFKHITPLQEQSKEVAIRIFQGCQFRSVEAVQEITEYAKSIPGFVNLDLNDQVTLTKY
 GVHEIIYTMLASLMNKDGVLI SEGQGFMTREFLKSRLKPFPGDFMEPKFEFAVKFNALELDD
 DLAIFIAVIIISGDRPGLLNVKPIEDIQDNLQALELQKL NHPESQLFAKLLQKMTDLRQ
 IVTEHVQLLQVIKKTETDMSLHPL LQEIYKDLY

35

5.2. Activité du plasmide pSG5-hPPARg2g2.

Les résultats présentés dans la figure 13 montrent que si l'activité induite est plus faible en utilisant hPPARg2g2 comme régulateur transcriptionnel (figure 13 a et b), le facteur d'induction par le ligand (figure 13 c) est beaucoup plus fort avec ce régulateur. La différence entre les deux régulateurs transcriptionnels s'explique par le fait que pour hPPARg2g2, le bruit de fond du système en absence de ligand est faible et reste faible, quelle que soit la quantité de régulateur présent. D'autre part, plus la quantité de hPPARg2g2 augmente, plus l'activité induite est forte, ce qui n'est pas le cas du système utilisant hPPARg2 qui semble saturer.

La présence d'un deuxième domaine de liaison au ligand (hPPARg2g2) confère donc au régulateur transcriptionnel une plus grande inductibilité par le ligand.

EXEMPLE 6 : Augmentation de l'activité finale des promoteurs inductibles.

6.1. Construction d'une cassette d'expression inductible comprenant l'intron de hEF1a. Construction du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3.

Un fragment d'ADN, contenant le premier intron du gène codant pour hEF1a (de la position +16 à la position +984 par rapport au site d'initiation de la transcription ; numéro d'accès à Genbank : E02627), a été amplifié par ACP en utilisant les oligonucléotides 25RDA35 (5' AGT CAC TAG TAA GCT TTT TGC CGC CAG AAC ACA GG 3' ; SEQ ID NO: 14) et 26RDA36 (5' AGT CAC TAG TCC ATG GCT GCC CAG TGC CTC ACG ACC 3' ; SEQ ID NO: 15) comme amorces. Ce fragment a été digéré par HindIII et NcoI puis a été cloné dans le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par HindIII et NcoI pour obtenir le plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3. Une représentation schématique du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3 est présentée dans la figure 14.

6.2. Activité du plasmide Jx10AS-CMV-EF-pGL3.

Dans le but d'augmenter l'activité finale du système, une séquence enhancer, située dans le premier intron du gène hEF1a, a été clonée au voisinage du promoteur inducible. Les résultats présentés dans la figure 15 montrent que la présence de la région enhancer augmente l'activité induite du système et ceci quelle que soit la quantité de régulateur transcriptionnel utilisée.

EXEMPLE 7 : Construction de plasmides comprenant à la fois une cassette d'expression du régulateur transcriptionnel et une cassette d'expression inducible.

7.1. Plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2.

Le plasmide pSG5-hPPARa(Koz) a été digéré par MluI et ScaI pour isoler le fragment MluI-ScaI de 1229 pb contenant la région 3' de l'ADN complémentaire de hPPARa. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pSL301 préalablement digéré par MluI et SmaI pour donner le plasmide pSL-3'hPPARa.

Le plasmide pSG5-hPPARa(Koz) a été digéré par Sall et MluI pour isoler le fragment Sall-MluI de 1406 pb contenant le promoteur précoce du virus SV40 et la région 5' de l'ADN complémentaire de hPPARa. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pSL-3'hPPARa préalablement digéré par XhoI et MluI pour donner le plasmide pSL-hPPARa.

Le plasmide pSL-hPPARa a été digéré par SpeI et Sall pour isoler le fragment SpeI-Sall de 2664 pb contenant le promoteur précoce du virus SV40 et l'ADN complémentaire de hPPARa. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pBluescript II SK+ préalablement digéré par SpeI et Sall pour donner le plasmide pBS-hPPARa.

Le plasmide pSG5-hPPARg2 a été digéré par AvrII et SacI pour isoler le fragment AvrII-SacI de 2070 pb, noté C, contenant la région 5' de l'ADN complémentaire de hPPARg2. Un fragment d'ADN, noté D, contenant la région

3' de l'ADN complémentaire de hPPARg2, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pSG5-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides 10RDA21 (5' CAG GTT TGC TGA ATG TGA AGC 3' ; SEQ ID NO: 16) et 11RDA40 (5' TGA CGT GTC GAC CTA GTA CAA GTC CTT GTA GAT CTC CTG C 3' ; SEQ ID NO: 17) comme amorces. Le fragment C et le fragment D, digéré par SacI et Sall, ont été clonés ensemble dans le plasmide pBS-hPPARa préalablement digéré par AvrII et Sall pour obtenir le plasmide pBS-hPPARg2.

Le plasmide Jx5AS-TK-pGL3 a été digéré par KpnI et Sall pour isoler le fragment KpnI-Sall de 2324 pb contenant le gène luc+ sous contrôle d'un promoteur inductible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pBS-hPPARg2 préalablement digéré par KpnI et Sall pour donner le plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2. Une représentation schématique du plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2 est présentée dans la figure 16.

7.2. Plasmide SV-g2-J10-C-pGL3.

Le plasmide pBS-hPPARg2 a été digéré par NotI et Sall pour isoler le fragment NotI-Sall de 2622 pb, noté E, contenant l'ADN complémentaire de hPPARg2 sous contrôle du promoteur précoce de SV40. Un fragment d'ADN, noté F, contenant le site de polyadénylation du virus SV40, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide FTK-pGL3 comme matrice et les oligonucléotides 18RDA31 (5' AGT CGT CGA CGC TTC GAG CAG ACA TGA TAA G 3' ; SEQ ID NO: 18) et 19RDA35 (5' AGT CGC TAG CGA CGG ATC CTT ATC GAT TTT ACC AC 3' ; SEQ ID NO: 19) comme amorces. Le fragment E et le fragment F, digéré par Sall et NheI, ont été clonés ensemble dans le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par NotI et NheI pour obtenir le plasmide SV-g2-J10-C-pGL3. Une représentation schématique du plasmide SV-g2-J10-C-pGL3 est présentée dans la figure 17.

7.3. Plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3.

Un fragment d'ADN, noté G, contenant l'ADN complémentaire de hPPARg2, a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide Jx5AS-TK-luc-hPPARg2 comme matrice et les oligonucléotides 12RDA50 (5' GTC AGC TAG CCT ACT CGA GCC ACC ATG GGT GAA ACT CTG GGA GAT TCT CC 3' ;
5 SEQ ID NO: 20) et 13RDA42 (5' TAC GGG GTA CCC AGA CAT GAT AAG ATA CAT TGA TGA GTT TGG 3' ; SEQ ID NO: 21) comme amorces. Un fragment d'ADN, noté H, contenant le promoteur minimum de hCMV-IE (de la position -54 à la position +48 par rapport au site d'initiation de la transcription), a été amplifié par ACP en utilisant le plasmide pCMVβ comme matrice et les oligonucléotides
10 14RDA33 (5' GTC AGC TAG CCG GTA GGC GTG TAC GGT GGG AGG 3' ; SEQ ID NO: 22) et 15RDA33 (5' TAC GCT CGA GCT TCT ATG GAG GTC AAA
ACA GCG 3' ; SEQ ID NO: 23) comme amorces. Le fragment G, digéré par KpnI et XhoI et le fragment H, digéré par XhoI et NheI ont été clonés ensemble dans le
15 plasmide Jx5AS-TK-pGL3 préalablement digéré par KpnI et NheI pour obtenir le plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3. Une représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 est présentée dans la figure 18.

7.4. Plasmides hPPARg2-CMV-JxnAS-CMV-pGL3.

20

Le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 a été digéré par NheI et SphI pour isoler le fragment NheI-SphI de 982 pb contenant la région 5' du gène luc+ sous contrôle d'un promoteur inducible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide hPPARg2-CMV-Jx5AS-TK-pGL3 préalablement digéré par SpeI et SphI pour donner le
25 plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3. Une représentation schématique du plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 est présentée dans la figure 19.

Le plasmide Jx5AS-CMV-pGL3 a été digéré par NheI et SphI pour isoler le fragment NheI-SphI de 982 pb contenant la région 5' du gène luc+ sous contrôle
30 d'un promoteur inducible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide hPPARg2-

CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par SpeI et SphI pour donner le plasmide hPPARg2-CMV-Jx15AS-CMV-pGL3.

Le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 a été digéré par NheI et SphI pour isoler le fragment NheI-SphI de 1151 pb contenant la région 5' du gène luc+ sous
5 contrôle d'un promoteur inducible. Ce fragment a été inséré dans le plasmide hPPARg2-CMV-Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par SpeI et SphI pour donner le plasmide hPPARg2-CMV-Jx20AS-CMV-pGL3.

10 **EXEMPLE 8 : Comparaison des différentes versions du système inducible in vitro.**

La figure 20 rassemble les résultats obtenus in vitro avec plusieurs versions du système inducible. Ces résultats montrent que les systèmes
15 utilisant deux plasmides (figure 20 lignes 1, 3 et 4) comme les systèmes à un seul plasmide (figure 20 lignes 2 et 5 à 9) sont fonctionnels ; c'est à dire que la présence d'un ligand de PPARg (ici le BRL49653) augmente fortement l'expression du gène placé sous le contrôle du promoteur inducible. On
20 remarque également que pour certains systèmes (figure 20 lignes 3 et 7 à 9) le facteur d'induction par le ligand est supérieur à 30, et que pour le système présenté sur la figure 20 ligne 4, l'activité après induction est égale à celle d'un promoteur fort comme celle du promoteur hCMV-IE.

25 **EXEMPLE 9 : Différents ligands des PPAR peuvent activer le système inducible.**

9.1. Système utilisant hPPARg2.

30 Les résultats présentés dans la figure 21 montrent que des ligands de hPPARg autres que le BRL49653, ici le RG12525 (ligand RPR de hPPARg),

peuvent être utilisés pour activer le système inductible. A une concentration de 100 μ M, un traitement avec le RG12525 conduit même à une induction plus forte que celle obtenue avec le BRL49653. Tout autre ligand de PPAR γ peut donc être utilisé comme inducteur du système.

5

9.2. Système utilisant hPPAR α .

De la même manière que pour le système utilisant hPPAR γ , un système utilisant hPPAR α comme régulateur transcriptionnel peut être activé avec les fibrates ou le WY-14,643 par exemple ou tout autre ligand de hPPAR α .

10

15

EXEMPLE 10 : Le système inductible peut être activé in vivo, dans le muscle.

La figure 22 rassemble les résultats obtenus in vivo, dans le muscle, avec différentes versions du système inductible. Les résultats montrent que pour les trois versions testées (figure 22 lignes 2 à 4), un traitement par gavage avec un ligand de hPPAR γ est capable d'augmenter fortement, dans le muscle, l'activité des promoteurs inductibles. Les facteurs d'induction sont : x14 pour la version figure 22 ligne 2, x8 pour la version figure 22 ligne 3, et x24 pour la version figure 22 ligne 4. De plus, pour l'une des versions (figure 22 ligne 2), l'activité obtenue chez les animaux traités au BRL49653 est de l'ordre de celle d'un promoteur fort comme le promoteur hCMV-IE.

20

25

Les résultats, présentés dans la figure 23, montrent également qu'une seule prise de ligand peut induire le système, que cette prise ait lieu avant ou après le transfert de gène. Cette expérience montre aussi qu'une dose deux fois moins importante que celle utilisée habituellement, permet d'obtenir le même facteur d'induction.

30

Le système, utilisant un récepteur nucléaire PPAR comme régulateur transcriptionnel, est donc fonctionnel in vivo et peut être induit par la prise orale d'un ligand des PPAR.

5 **EXEMPLE 11 : Construction d'un plasmide permettant l'expression inductible d'un gène dont le produit est sécrété.**

11.1 Construction du plasmide pRDA02.

10 Le plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 a été digéré par HindIII et MluI pour isoler le fragment HindIII-MluI de 459 pb. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pXL3010 (Bettan M. et coll., *Anal. Biochem.*, **271** (1999) 187-189) préalablement digéré par HindIII et MluI pour donner le plasmide pRDA02. Ce plasmide contient l'ADN complémentaire du gène codant pour la forme sécrétée de la phosphatase
15 alcaline placentaire humaine (hSeAP) dont l'expression est sous contrôle d'un promoteur inductible par le système utilisant les PPARs comme régulateur transcriptionnel. Une représentation schématique du plasmide pRDA02 est présentée dans la figure 24.

20

EXEMPLE 12 : Le système inductible permet de réguler, in vivo, la concentration plasmatique d'une protéine sécrétée.

Les résultats présentés dans la figure 25 montrent qu'en utilisant le
25 système inductible, il est possible de réguler dans le temps la concentration plasmatique d'une protéine sécrétée à partir du muscle, et ceci avec une simple prise orale d'un ligand des PPAR. La concentration plasmatique de la hSeAP est augmentée d'un facteur 18 (figure 25A) deux jours après la prise de ligand, puis retourne à son niveau de base une semaine plus tard. Entre le 21^{ème} et le 39^{ème}
30 jour, une réponse immunitaire dirigée contre la hSeAP d'origine humaine est observée et se traduit par une diminution de la concentration plasmatique de

cette protéine. Malgré cette réponse immune, il est possible de réaliser un second cycle d'induction (figure 25A).

Comme le montre la figure 25B, le système inductible permet également, par des prises de ligand journalières, de maintenir à un niveau élevé le taux plasmatique de hSeAP, durant une période égale à la durée du traitement.

EXEMPLE 13 : Différents ligands des PPAR peuvent activer le système inductible in vivo, et ceci de manière dose dépendante.

10

Le BRL49653, sous sa forme commercialisée pour le traitement du diabète de type II (Avandia™, SmithKline Beecham) et le pioglitazone, sous sa forme commercialisée pour ce même traitement (Actos™, Takeda Pharmaceuticals) peuvent également activer le système inductible (figure 26A). La figure 26B montre également que le facteur d'induction est directement corrélé à la dose de ligand utilisée.

15

Le système, utilisant un récepteur nucléaire PPAR comme régulateur transcriptionnel, permet donc de contrôler, de manière très précise, le taux plasmatique d'une protéine sécrétée. De plus, cette régulation peut être obtenue en utilisant divers ligands des PPAR.

20

EXEMPLE 14 : Construction d'un plasmide permettant l'expression inductible d'un gène dont le produit est un facteur angiogénique.

25

14.1 Construction du plasmide Jx10AS-CMV-VEGF_A165.

Le cadre de lecture de VEGF165 humain a été cloné par transcription reverse et PCR à partir d'ARN total de placenta humain (Clontech) (Houck et al. *Mol. Endocrinol.* **12** (1991) 1806-1814) puis inséré dans un plasmide pBluescript (Stratagene) contenant le promoteur CMV E/P de la position -522 à +72 et le

30

polyA tardif de SV40, pour donner le plasmide pXL3218. Ce dernier a été ensuite digéré par HindIII et BsrGI pour isoler le fragment A HindIII-BsrGI de 482 pb. Le plasmide pXL3218 a également été digéré par BsrGI et BamHI pour isoler le fragment B BsrGI-BamHI de 390 pb. Les fragments A et B ont été insérés dans le

5 plasmide Jx10AS-CMV-pGL3 préalablement digéré par HindIII et BamHI pour donner le plasmide Jx10AS-CMV-VEGF_A165. Ce plasmide contient l'ADN complémentaire du gène codant pour le VEGF_A165 dont l'expression est sous contrôle d'un promoteur inductible par le système utilisant les PPARs comme régulateur transcriptionnel. Une représentation schématique du plasmide

10 Jx10AS-CMV-VEGF_A165 est présentée dans la figure 27.

Ce plasmide pourra être utilisé, par exemple, pour contrôler dans le temps l'activité angiogénique du VEGF à des fins thérapeutiques.

REVENDEICATIONS

1. Composition comprenant :

5 (a) un premier élément comprenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible comprenant un élément de réponse à un PPAR et un promoteur transcriptionnel minimal, et

(b) un deuxième élément comprenant un acide nucléique codant un PPAR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel,
en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

10

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre:

(c) un ligand de PPAR.

en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

15

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les éléments (a) et (b) sont portés par des constructions génétiques distinctes.

4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les
20 éléments (a) et (b) sont assemblés dans une même construction génétique.

5. Composition selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce que la construction génétique est un vecteur plasmidique ou viral.

25 6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de liaison du PPAR.

7. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de
30 réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO:1 ou de variants fonctionnels de cette séquence.

8. Composition selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO: 5 ou de variants fonctionnels de cette séquence.
- 5
9. Composition selon les revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'élément de réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus préférentiellement de 5 à 15.
- 10
10. Composition selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisée en ce que le promoteur minimal est un promoteur d'un gène cellulaire ou viral délété de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle.
11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le
- 15
- promoteur inductible comprend en outre une région amplificatrice.
12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont dans la même orientation.
- 20
13. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont en orientation inverse.
- 25
14. Composition selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR α ou un PPAR γ .
15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR modifié comprenant
- 30
- plusieurs sites de liaison au ligand.

16. Composition selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un élément (d) comprenant un acide nucléique codant un RXR sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel.
- 5 17. Vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b) selon la revendication.
18. Vecteur selon la revendication 17, caractérisé en ce que les éléments (a) et (b) sont en orientation opposée.
- 10 19. Vecteur selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que le promoteur inductible de l'élément (a) et le promoteur transcriptionnel de l'élément (b) sont assemblés dans le vecteur pour former un promoteur bidirectionnel régulable.
- 15 20. Vecteur selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend, dans le sens 5'→3', un premier acide nucléique codant un PPAR, un premier promoteur transcriptionnel minimal contrôlant l'expression dudit premier acide nucléique, un ou plusieurs éléments de réponse à un PPAR, un deuxième promoteur transcriptionnel minimal et, sous le contrôle dudit deuxième
- 20 promoteur transcriptionnel minimal, un deuxième acide nucléique codant un produit d'intérêt.
21. Vecteur selon l'une des revendications 17 à 20 caractérisé en ce qu'il comprend en outre un élément (d) selon la revendication 16.
- 25 22. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21 pour exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ex vivo ou in vitro.
- 30 23. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21 pour la préparation d'un

produit destiné à exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule in vivo.

24. Procédé pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule, in vitro ou ex vivo comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21.
25. Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule mammifère, de préférence humaine.
26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule musculaire.
27. Cellule modifiée par mise en contact avec une composition selon l'une des revendications 1 à 16 ou un vecteur selon l'une des revendications 17 à 21.
28. PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.
29. Acide nucléique codant pour un PPAR selon la revendication 28.
30. Procédé d'identification de ligands des PPAR, comprenant la mise en contact d'une cellule selon la revendication 27 avec une molécule test et la mise en évidence d'une expression de l'acide nucléique d'intérêt.

REVENDICATIONS MODIFIEES

[reçues par le Bureau international le 3 janvier 2001 (03.01.01);
revendications originales 1-30 remplacées par les nouvelles revendications 1-33 (4 pages)]

1. Composition comprenant :

(a) un premier élément comprenant un acide nucléique d'intérêt sous contrôle d'un promoteur inductible comprenant un élément de réponse à un PPAR et un promoteur transcriptionnel minimal, et

(b) un deuxième élément comprenant un acide nucléique codant un PPAR sous contrôle d'un promoteur transcriptionnel,
en vue de leur utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre:

(c) un ligand de PPAR.

en vue d'une utilisation simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les éléments (a) et (b) sont portés par des constructions génétiques distinctes.**4. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que les éléments (a) et (b) sont assemblés dans une même construction génétique.****5. Composition selon la revendication 3 ou 4, caractérisée en ce que la construction génétique est un vecteur plasmidique ou viral.****6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que le vecteur viral est un virus adéno-associé (AAV).****7. Composition selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de liaison du PPAR.****8. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO:1 ou de variants fonctionnels de cette séquence.**

9. Composition selon la revendication 7, caractérisée en ce que l'élément de réponse à un PPAR comprend un ou plusieurs sites de séquence SEQ ID NO: 5 ou de variants fonctionnels de cette séquence.

10. Composition selon les revendications 7 à 9, caractérisée en ce que l'élément de réponse comprend jusqu'à 30 sites de liaison, de préférence de 3 à 20, plus préférentiellement de 5 à 15.

11. Composition selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisée en ce que le promoteur minimal est un promoteur d'un gène cellulaire ou viral délété de région(s) non essentielle(s) à l'activité transcriptionnelle.

12. Composition selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en ce que le promoteur inductible comprend en outre une région amplificatrice.

13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont dans la même orientation.

14. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce que le promoteur minimal et l'élément de réponse à un PPAR sont en orientation inverse.

15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR α ou un PPAR γ .

16. Composition selon l'une des revendications 1 à 15, caractérisée en ce que l'acide nucléique codant un PPAR code un PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.

17. Composition selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un élément (d) comprenant un acide nucléique codant un RXR sous le contrôle d'un promoteur transcriptionnel.



18. Vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b) selon la revendication 1.
19. Vecteur selon la revendication 18, caractérisé en ce que les éléments (a) et (b) sont en orientation opposée.
20. Vecteur selon la revendication 18 ou 19, caractérisé en ce que le promoteur inductible de l'élément (a) et le promoteur transcriptionnel de l'élément (b) sont assemblés dans le vecteur pour former un promoteur bidirectionnel régulable.
21. Vecteur selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il comprend, dans le sens 5'→3', un premier acide nucléique codant un PPAR, un premier promoteur transcriptionnel minimal contrôlant l'expression dudit premier acide nucléique, un ou plusieurs éléments de réponse à un PPAR, un deuxième promoteur transcriptionnel minimal et, sous le contrôle dudit deuxième promoteur transcriptionnel minimal, un deuxième acide nucléique codant un produit d'intérêt.
22. Vecteur selon l'une des revendications 18 à 21 caractérisé en ce qu'il comprend en outre un élément (d) selon la revendication 17.
23. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 17 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 18 à 22 pour exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule ex vivo ou in vitro.
24. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 17 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 18 à 22 pour la préparation d'un produit destiné à exprimer un acide nucléique d'intérêt dans une cellule in vivo.
25. Procédé pour l'expression régulée d'un acide nucléique dans une cellule, in vitro ou ex vivo, comprenant la mise en contact de ladite cellule avec une composition selon l'une des revendications 1 à 17 ou un vecteur selon l'une des revendications 18 à 22.

26. Procédé selon la revendication 25, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule mammifère, de préférence humaine.
27. Procédé selon la revendication 26, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une cellule musculaire.
28. Procédé de régulation de l'expression d'un acide nucléique in vivo comprenant l'administration d'une composition selon l'une des revendications 1 à 17 ou d'un vecteur selon l'une des revendications 18 à 22.
29. Cellule modifiée par mise en contact avec une composition selon l'une des revendications 1 à 17 ou un vecteur selon l'une des revendications 18 à 22.
30. PPAR modifié comprenant plusieurs sites de liaison au ligand.
31. Acide nucléique codant pour un PPAR selon la revendication 30.
32. Procédé d'identification de ligands des PPARs, comprenant la mise en contact d'une cellule selon la revendication 29 avec une molécule test et la mise en évidence d'une expression de l'acide nucléique d'intérêt.
33. Procédé d'identification de ligands des PPARs in vivo caractérisé en ce que l'on administre une composition selon l'une des revendications 1 à 17 ou un vecteur selon l'une des revendications 18 à 22 ainsi qu'une molécule test, et que l'on met en évidence une expression de l'acide nucléique d'intérêt.

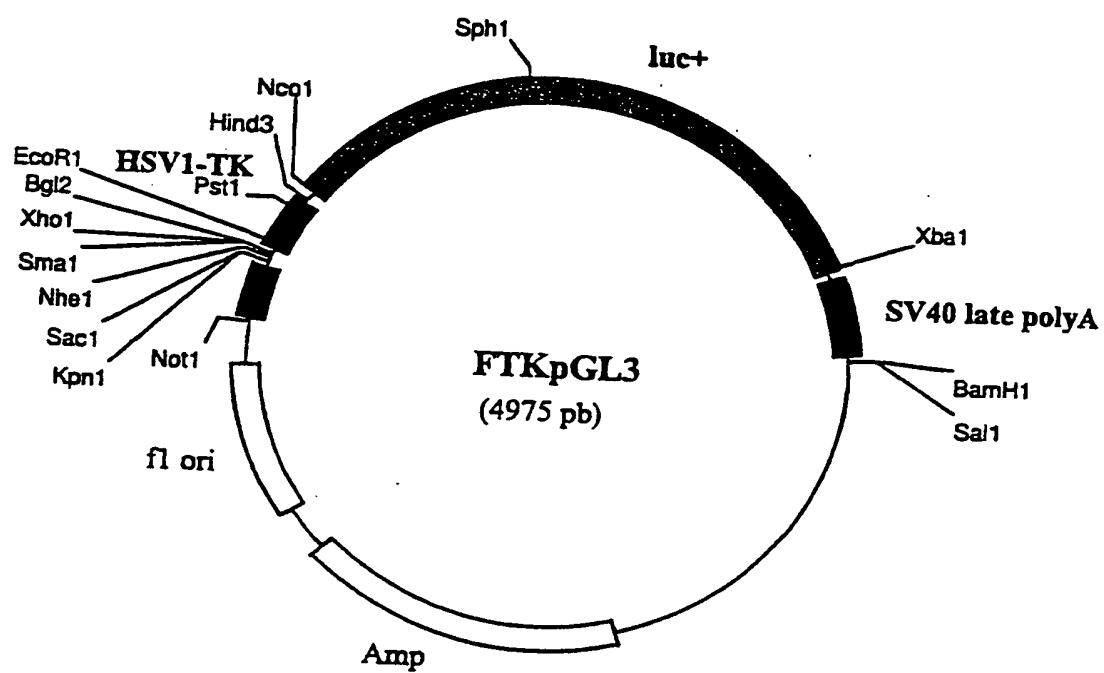
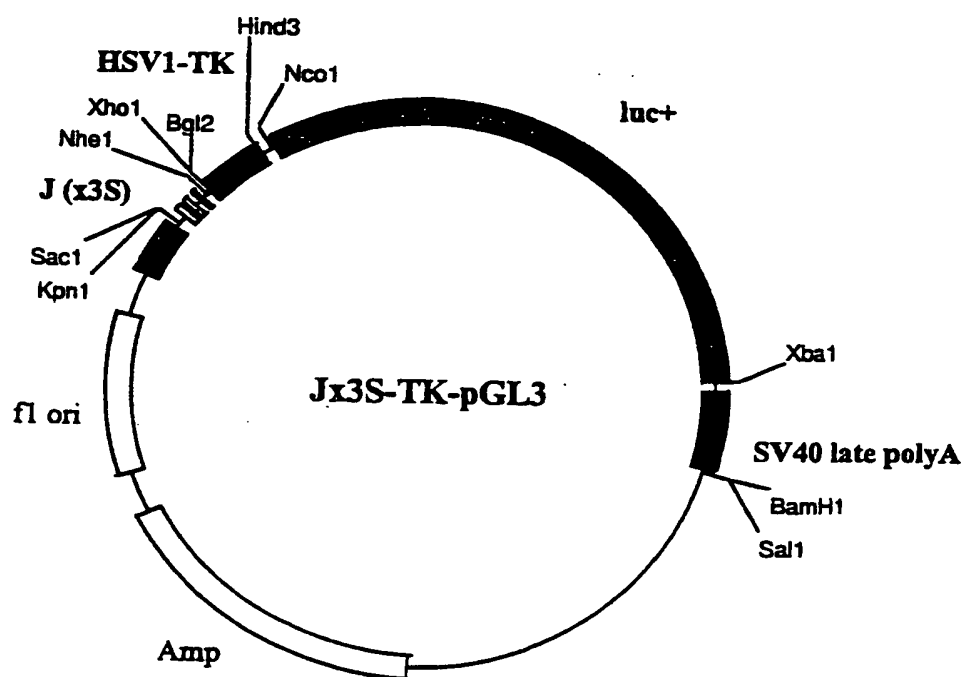
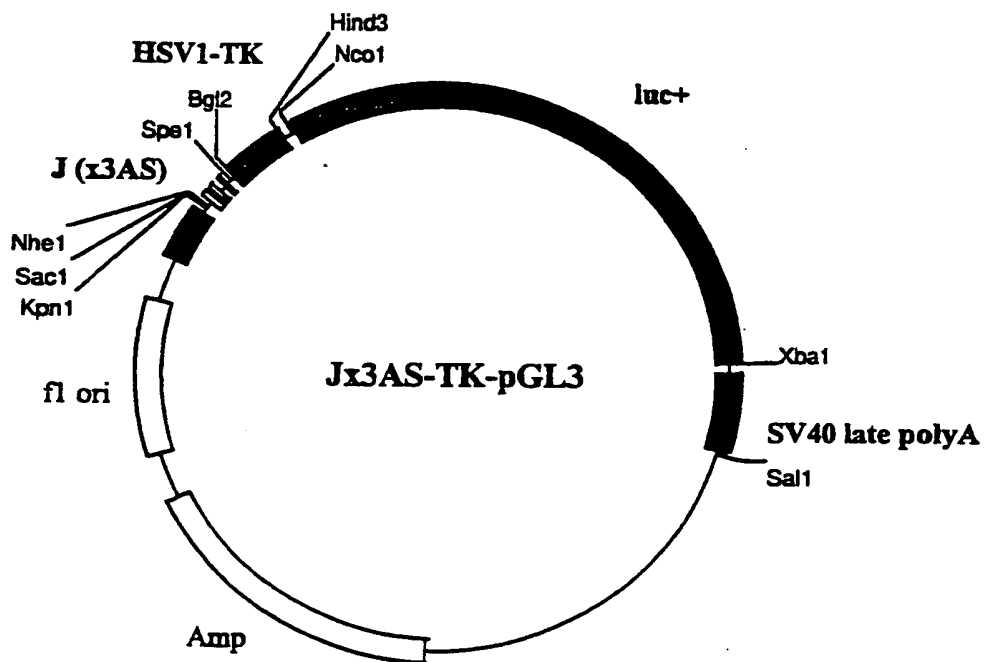


FIGURE 1

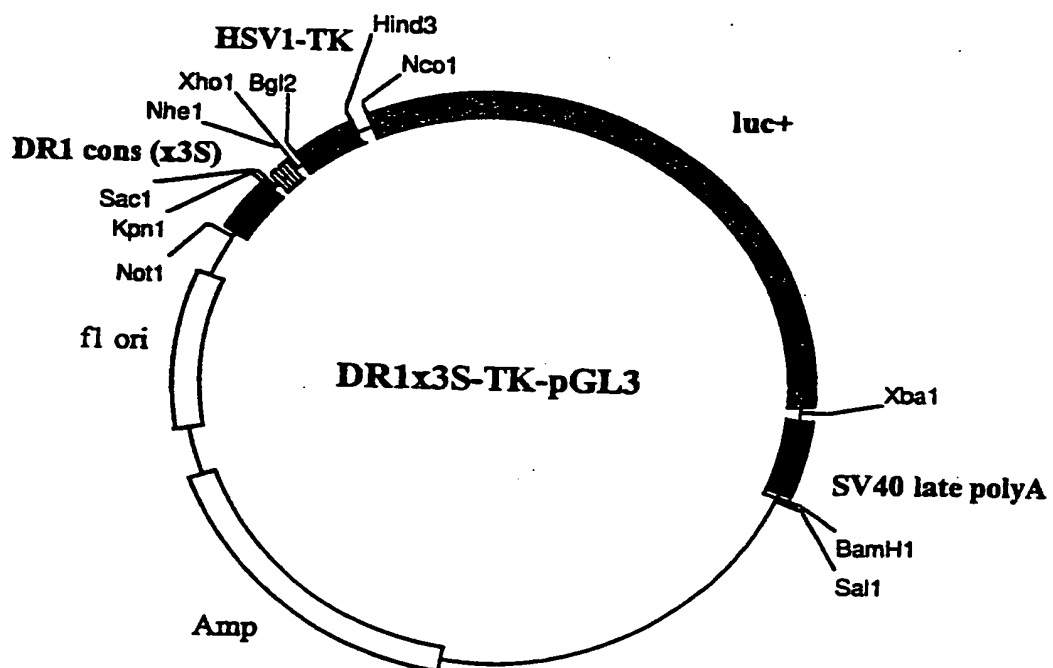
2/27



3/27



4/27



5/27

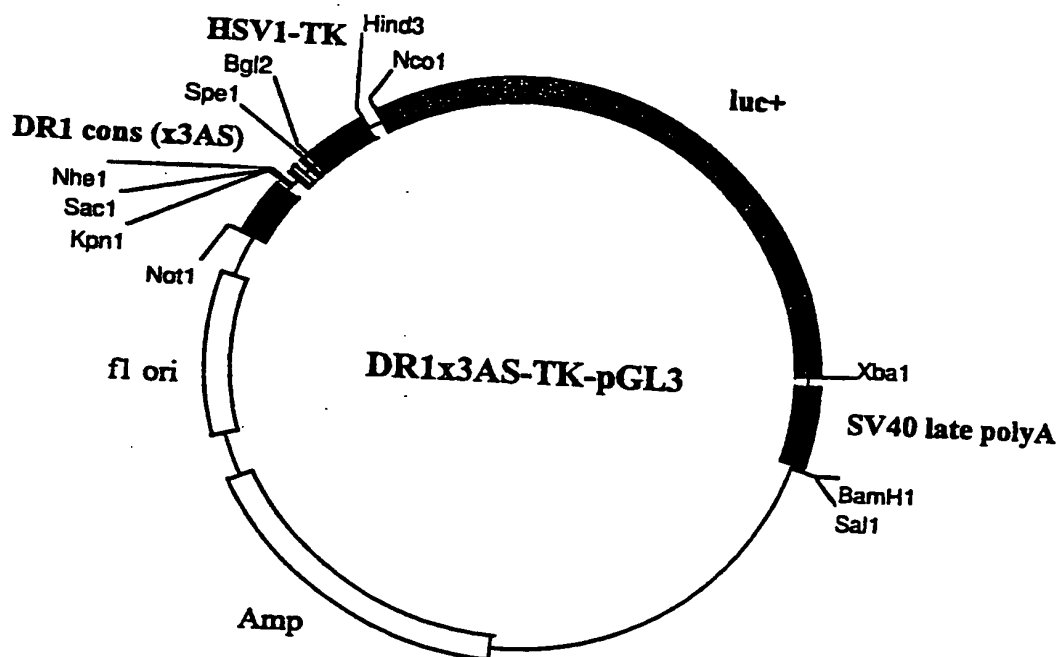


FIGURE 5

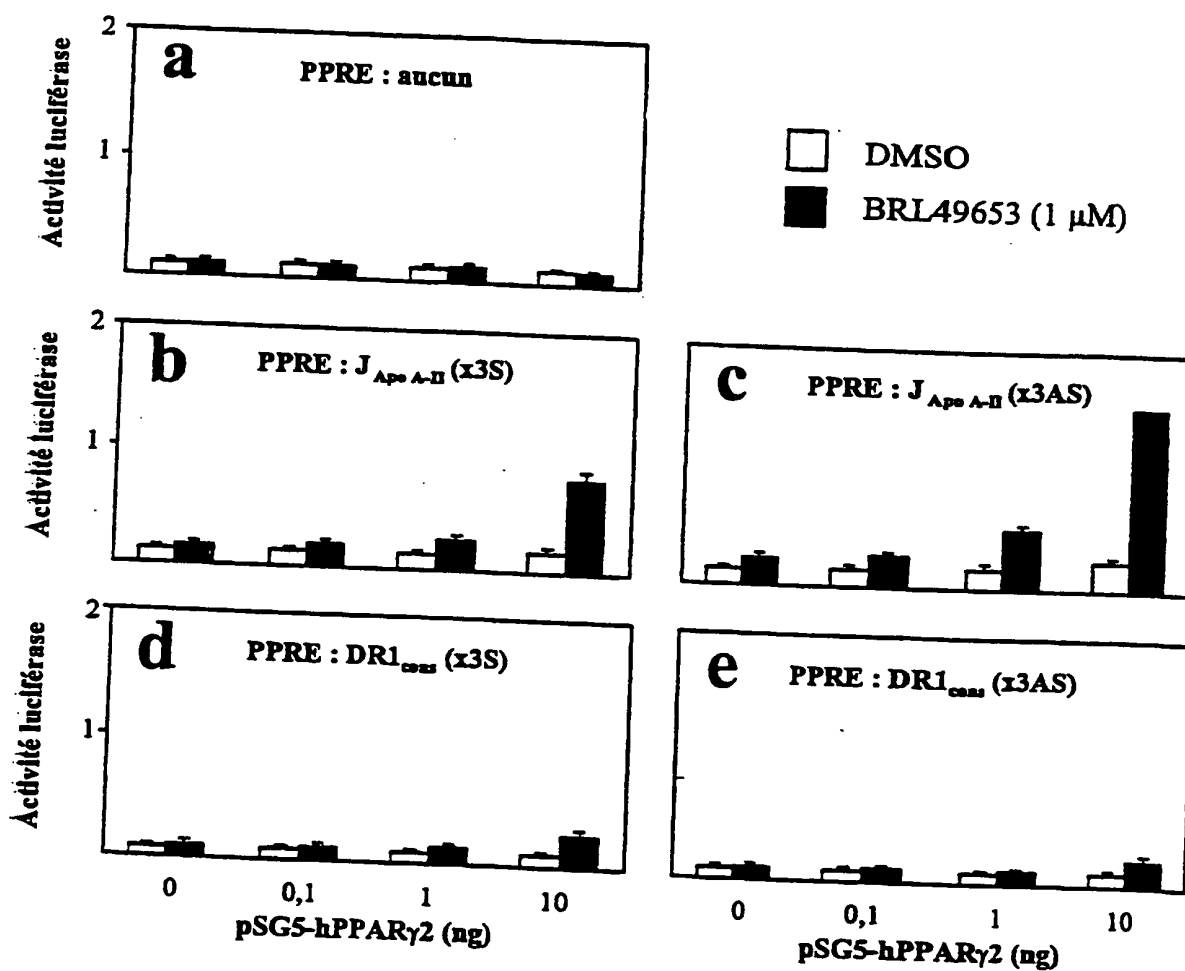
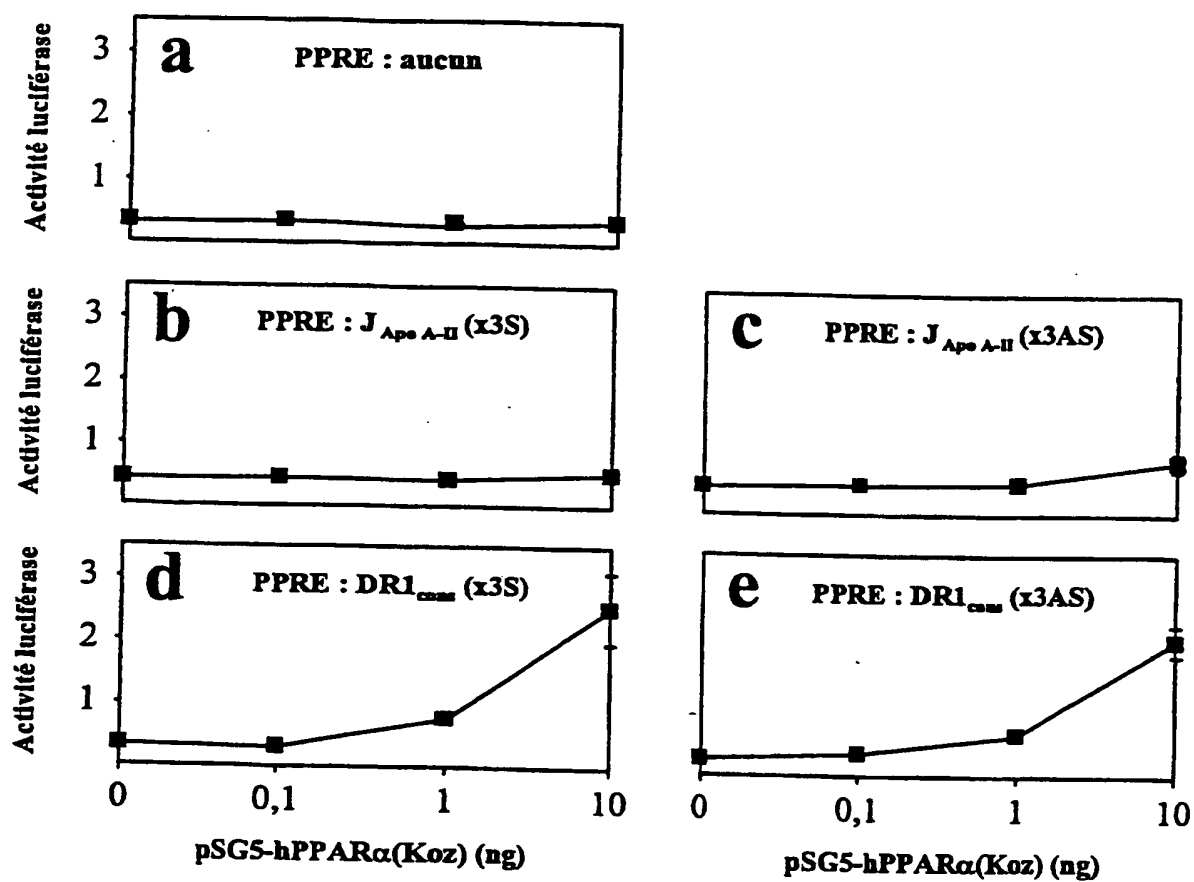


FIGURE 6

7/27



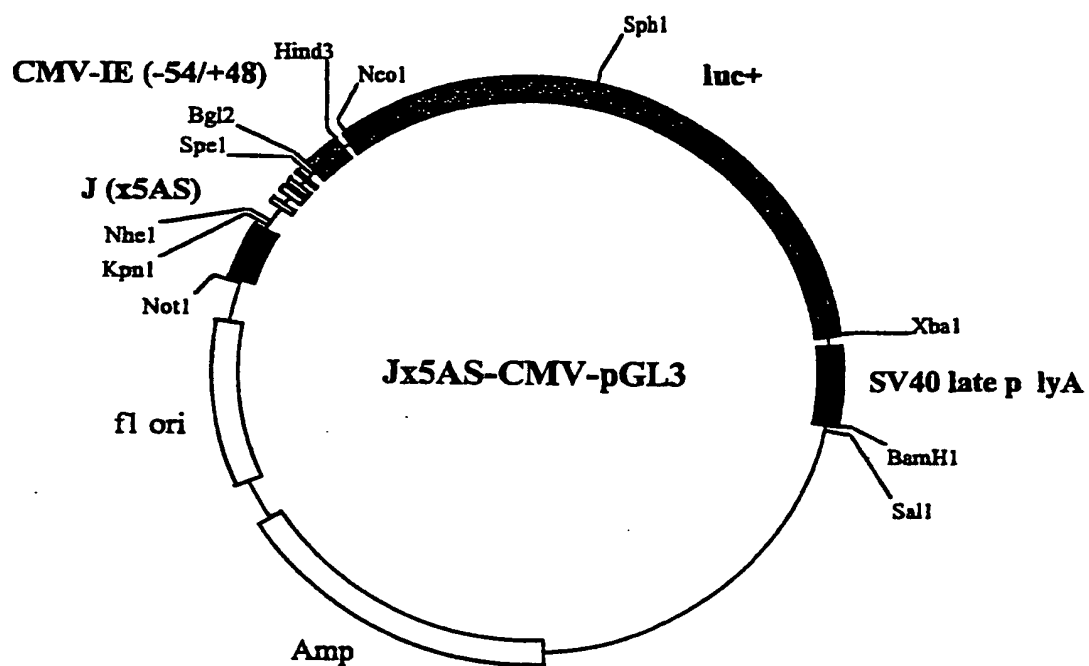
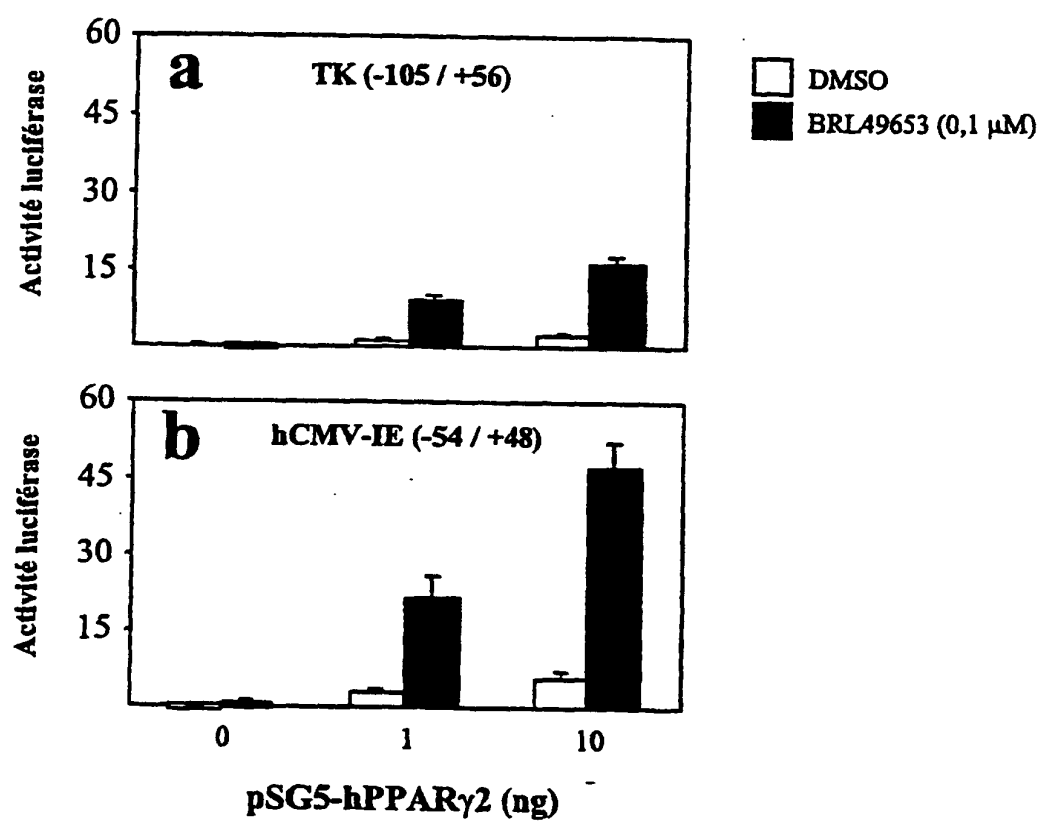
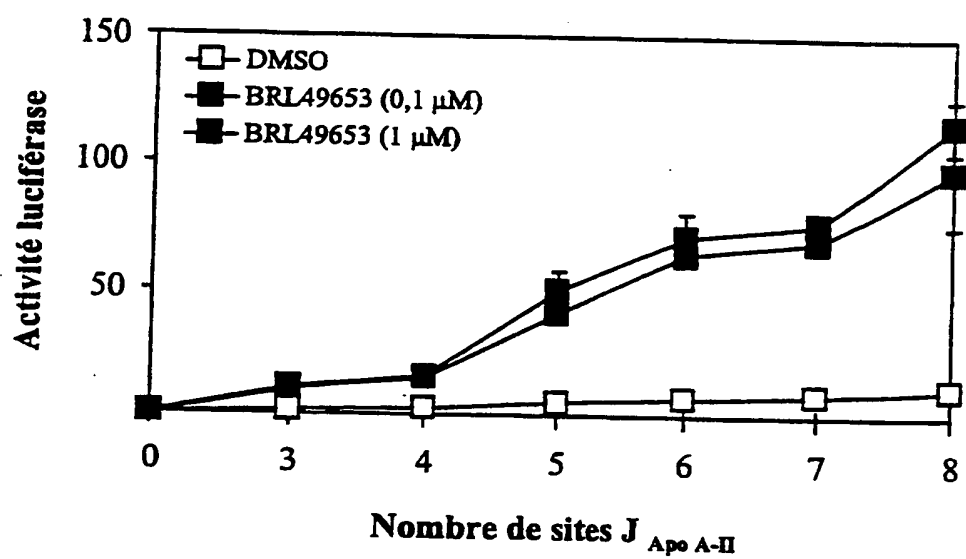


FIGURE 8

9/27



10/27



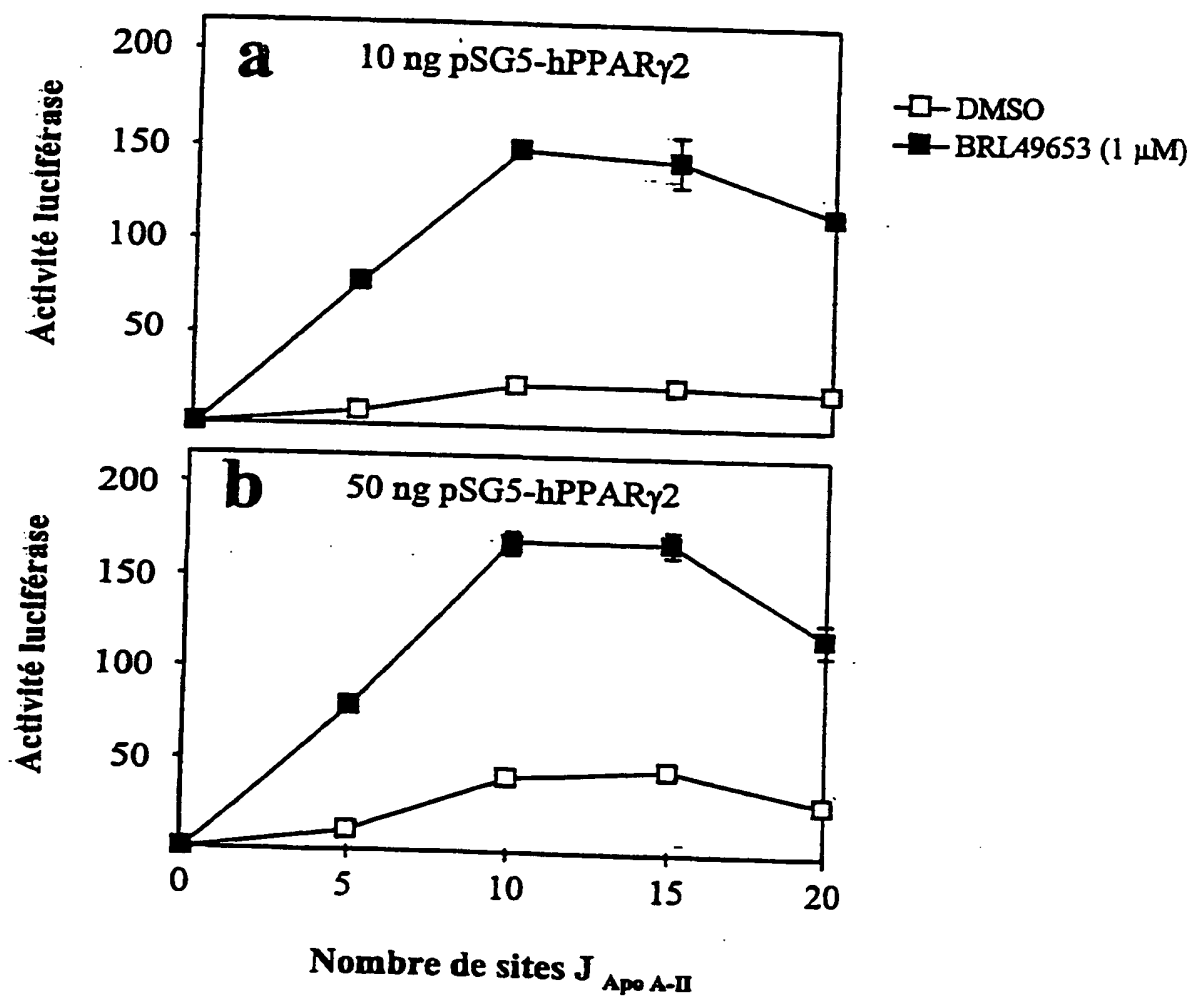
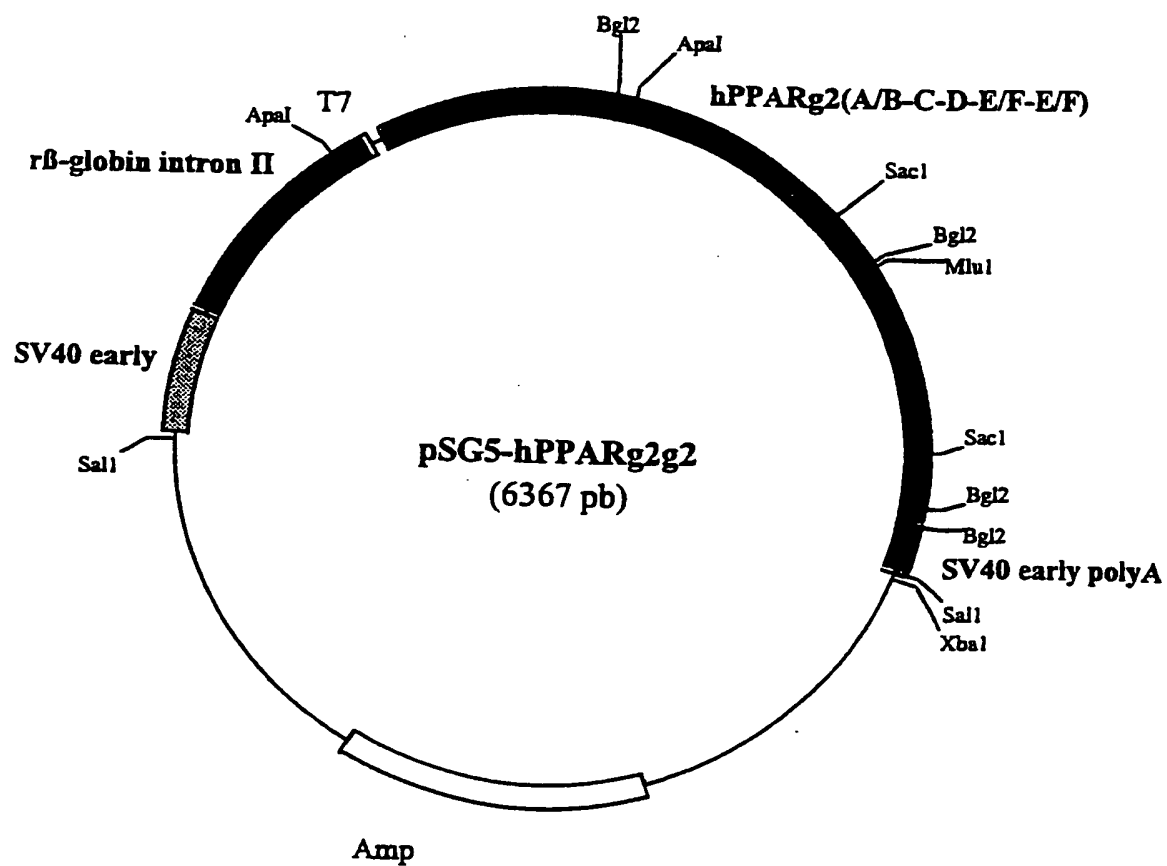


FIGURE 11

12/27



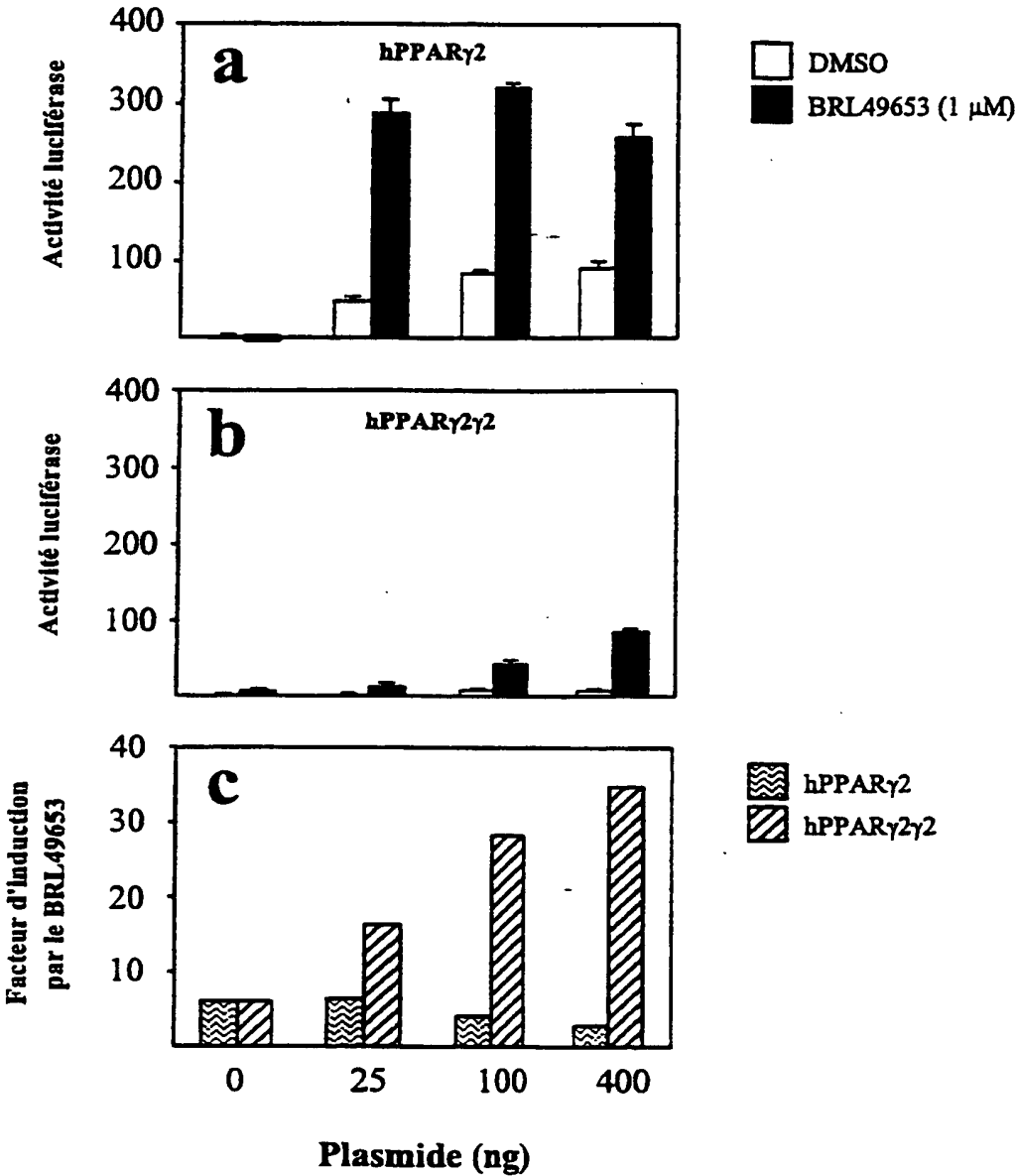
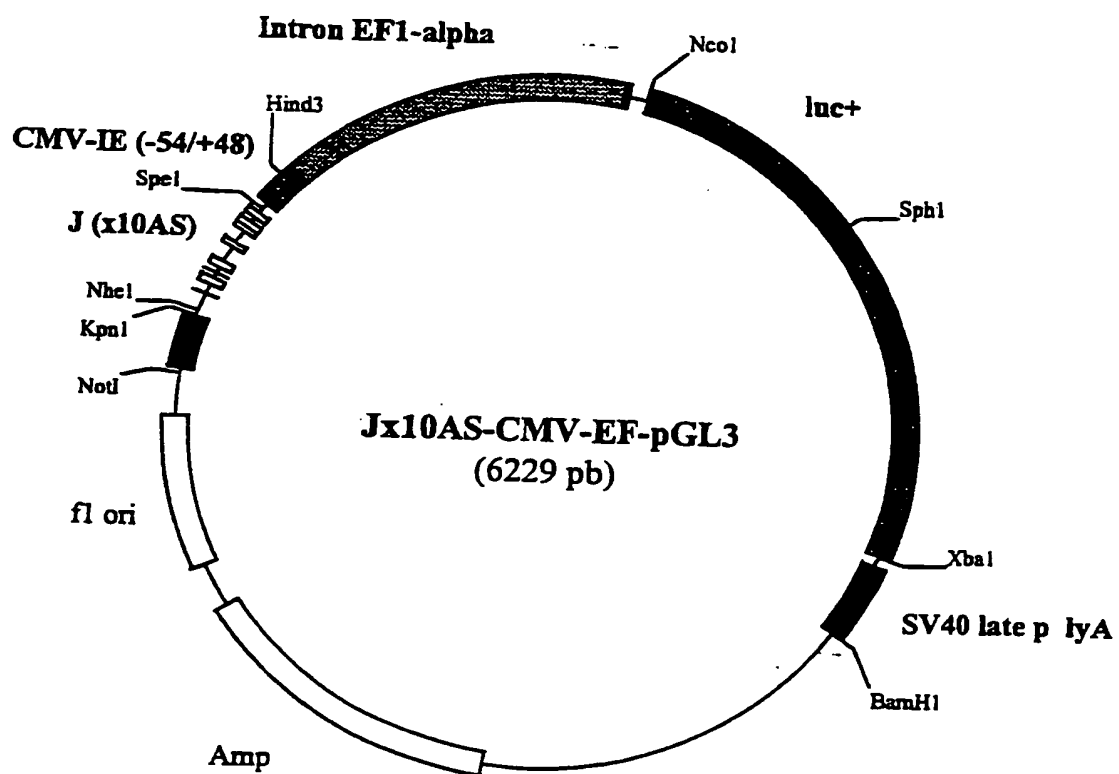


FIGURE 13

14/27



15/27

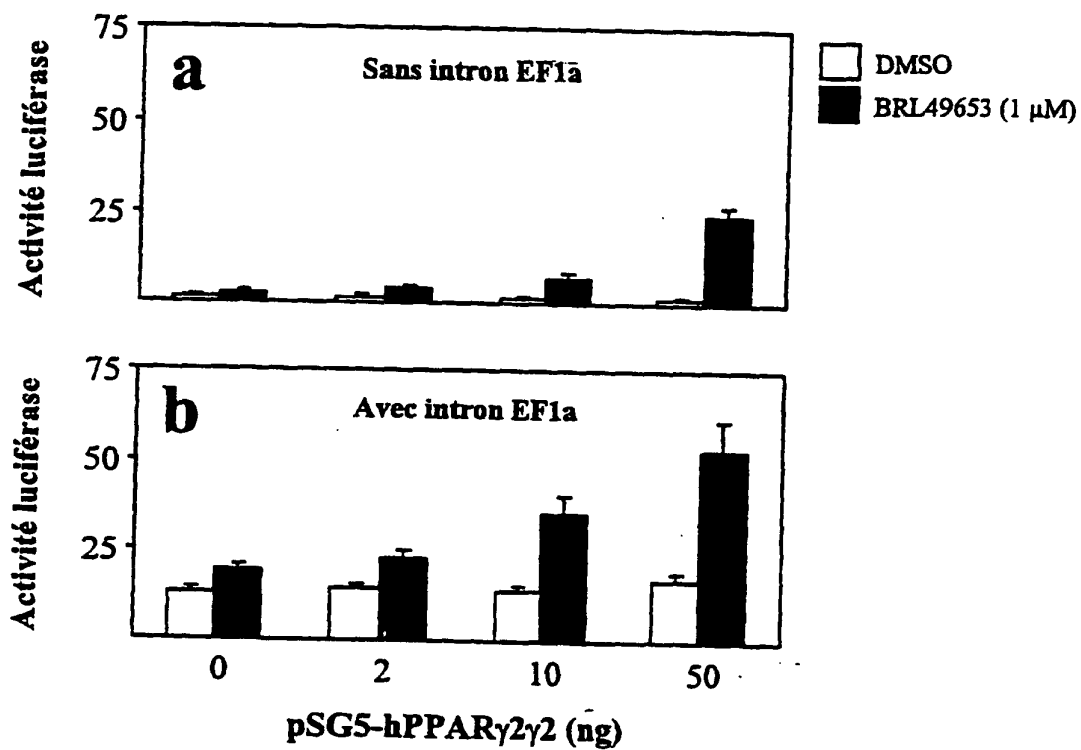


FIGURE 15

16/27

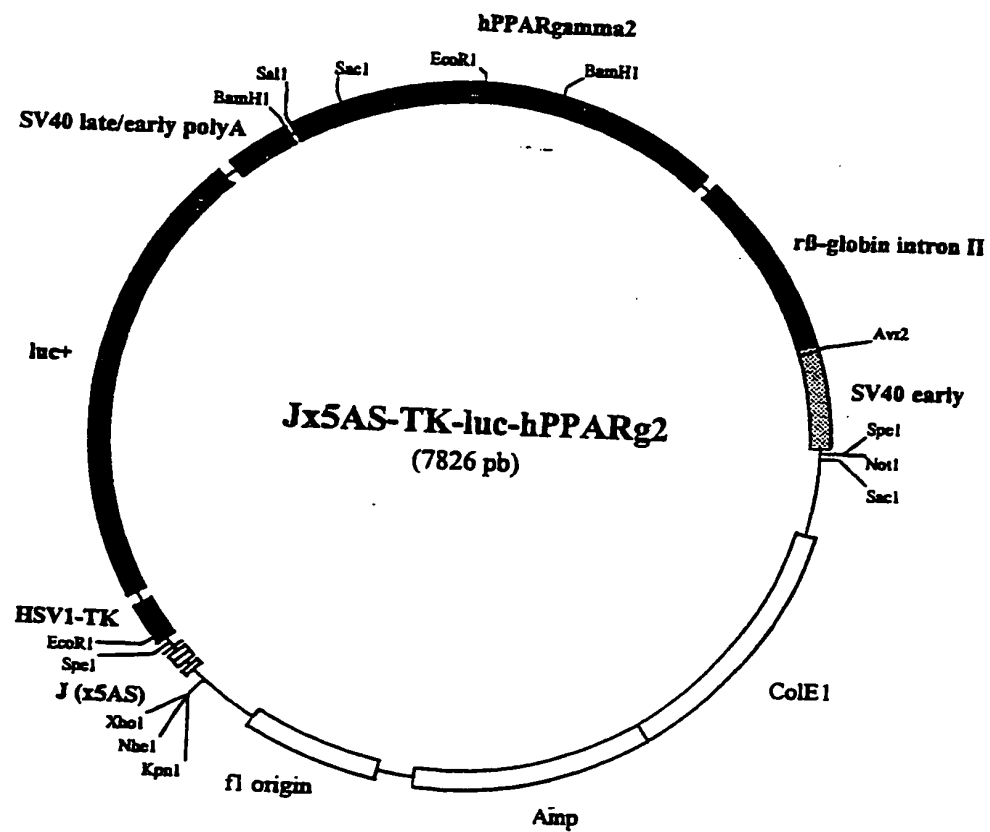
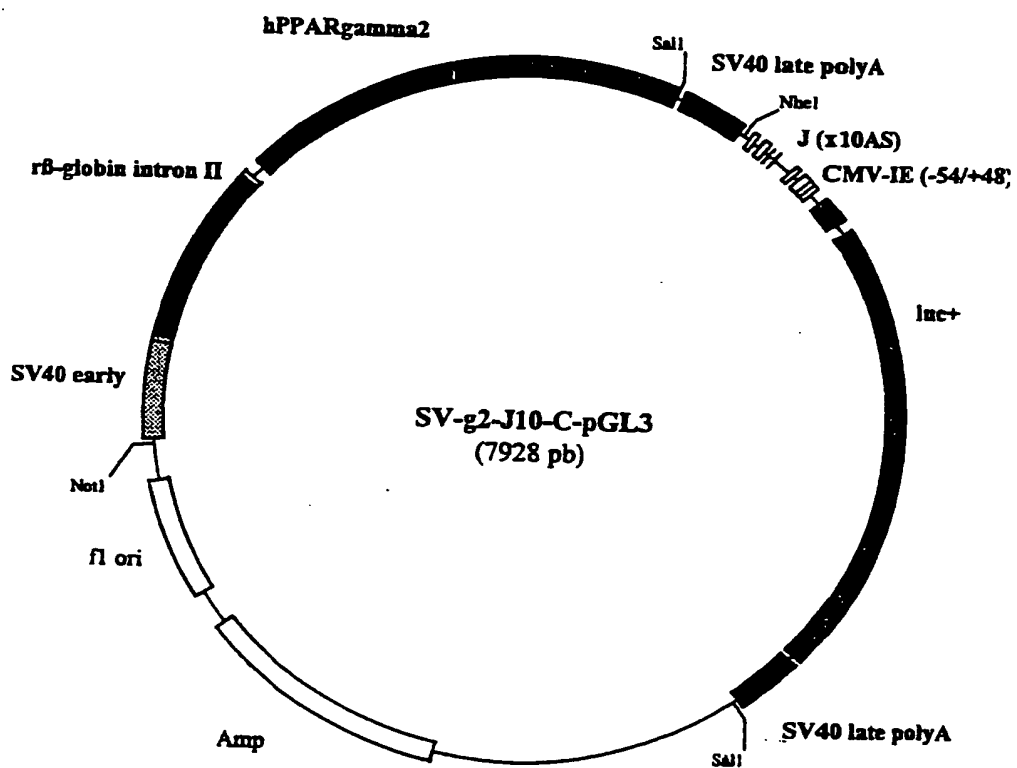


FIGURE 16

17/27



18/27

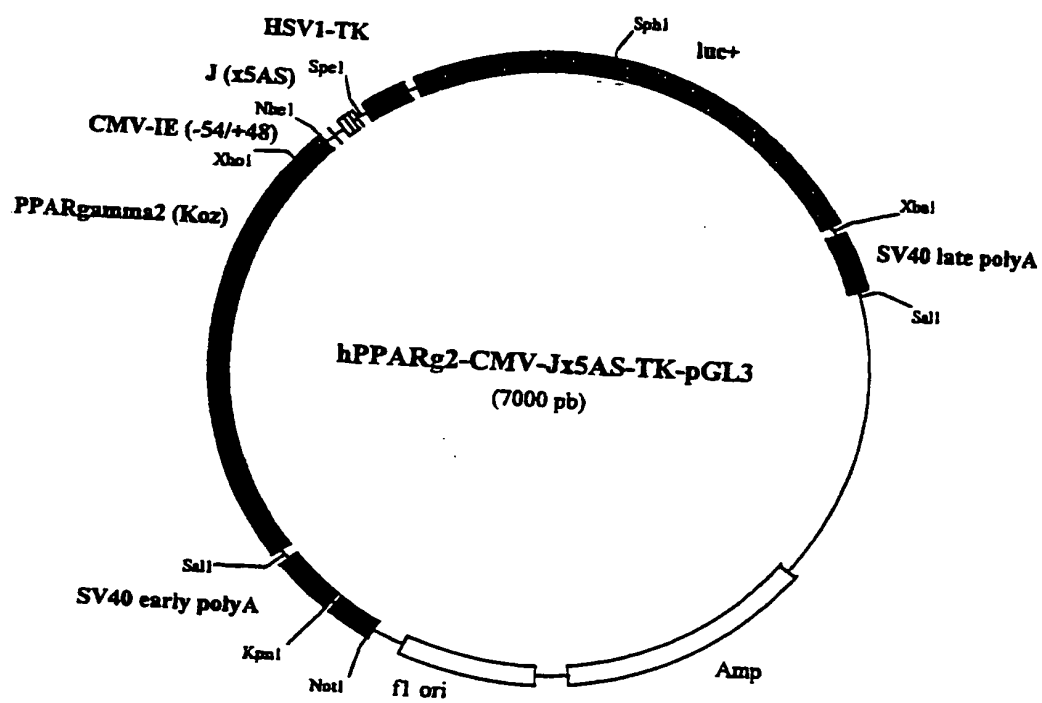
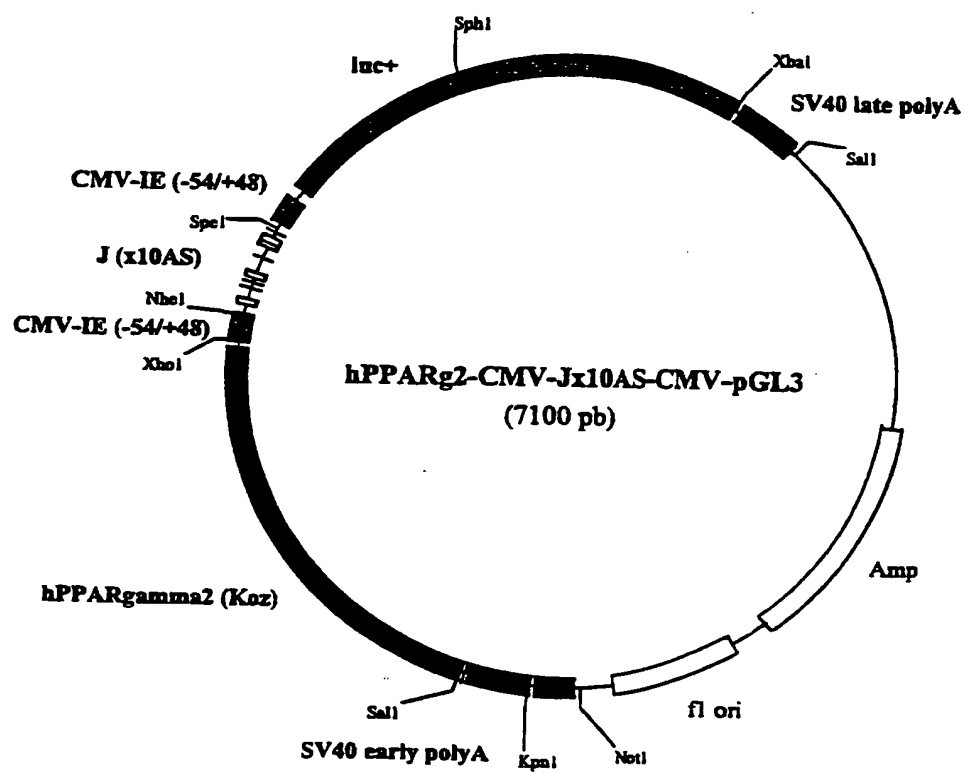


FIGURE 18

19/27



20/27

		Facteur d'induction par le BRL49653	Pourcentage de hCMV-IE
1		x 13	27 %
2		x 9	6 %
3		x 31	9 %
4		x 8	108 %
5		x 9	38 %
6		x 14	2 %
7		x 34	4 %
8		x 31	6 %
9		x 33	4 %

: promoteur SV40

: luc+

: promoteur TK (-105 / +56)

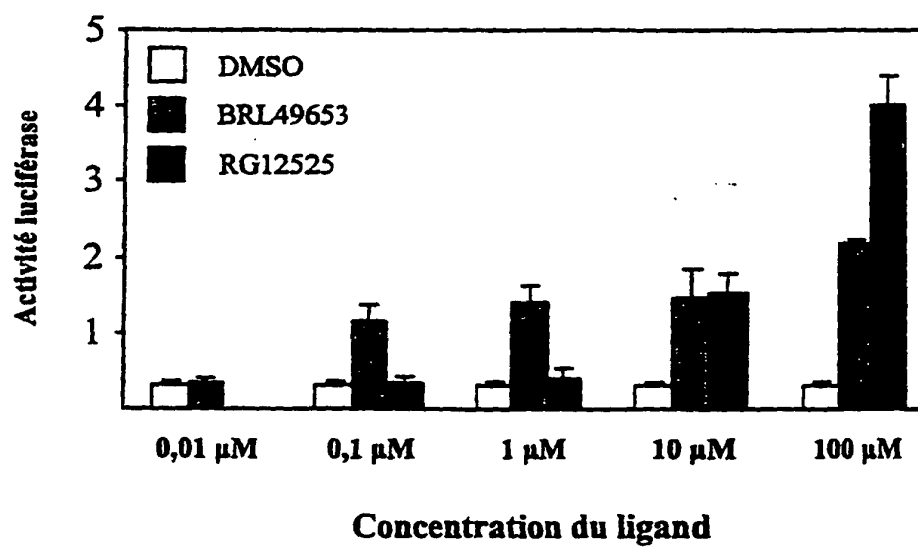
 : hPPAR γ 2

: promoteur CMV (-54 / +48)

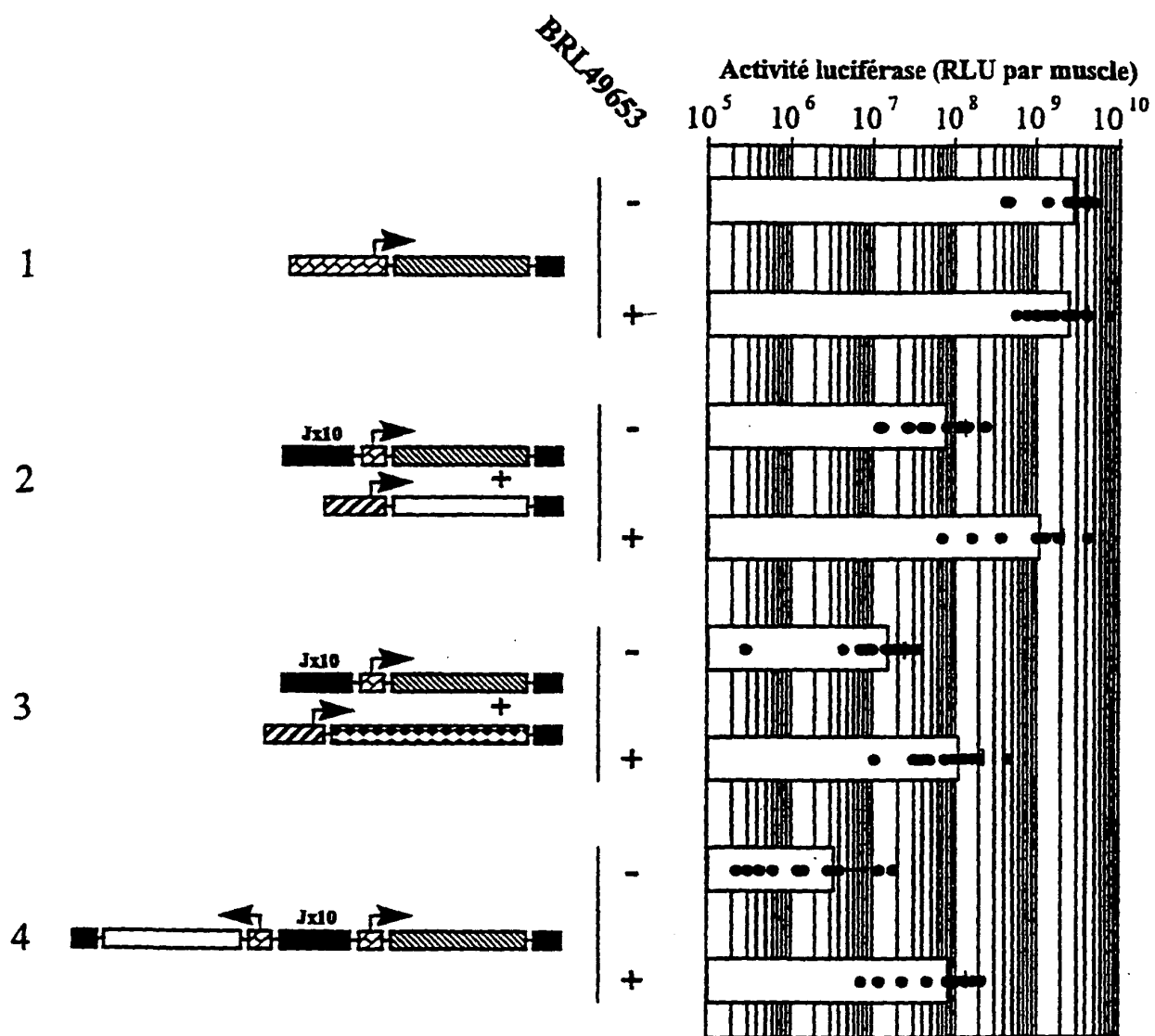
 : hPPAR γ 2 γ 2

 : sites J_{Apo A-II}

: poly A

a**b**

22/27



▨ : promoteur SV40

▨ : promoteur CMV (-522 / +72)

▨ : promoteur CMV (-54 / +48)

■ : sites J_{Apo A-II}

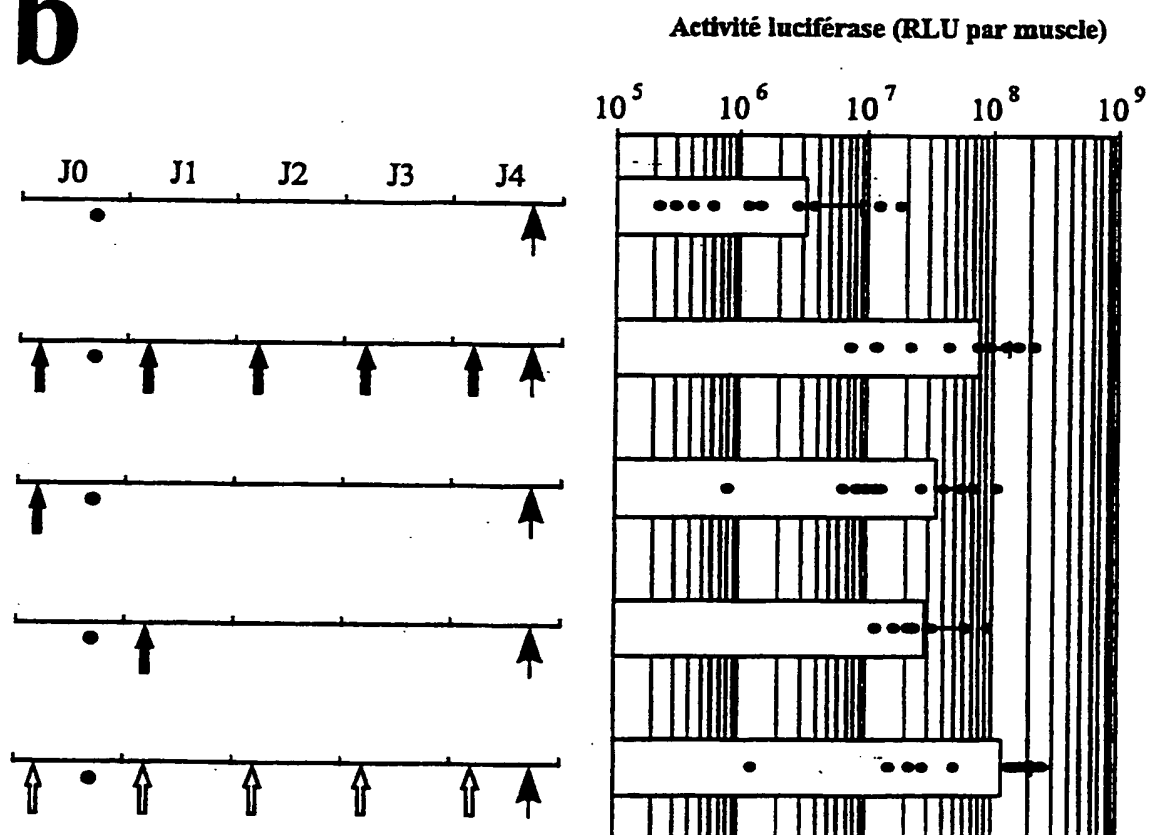
▨ : luc+

□ : hPPAR γ 2

▨ : hPPAR γ 2 γ 2

■ : poly A

23/27

a**b**

↑ : prise de BRL49653 (30 mg/kg)

↑ : prise de BRL49653 (15 mg/kg)

↑ : injection du plasmide et électrotransfert

↑ : sacrifice des animaux

24/27

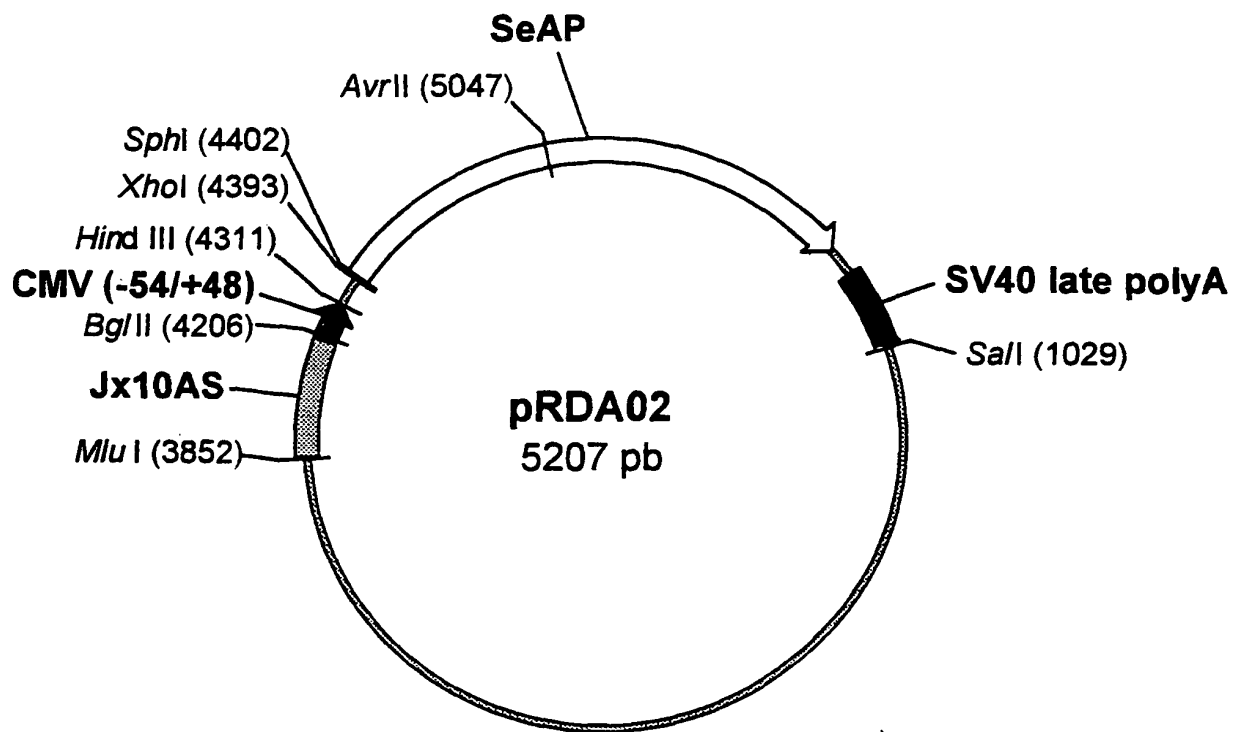


FIGURE 24

25/27

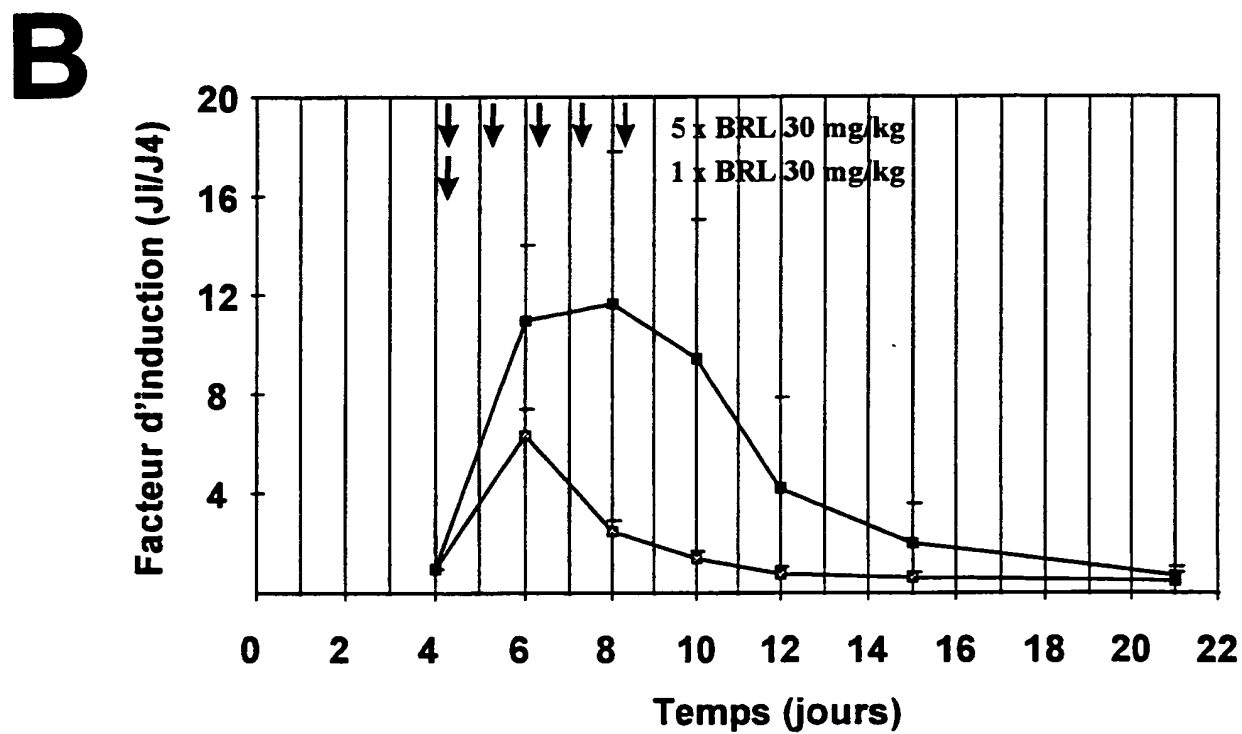
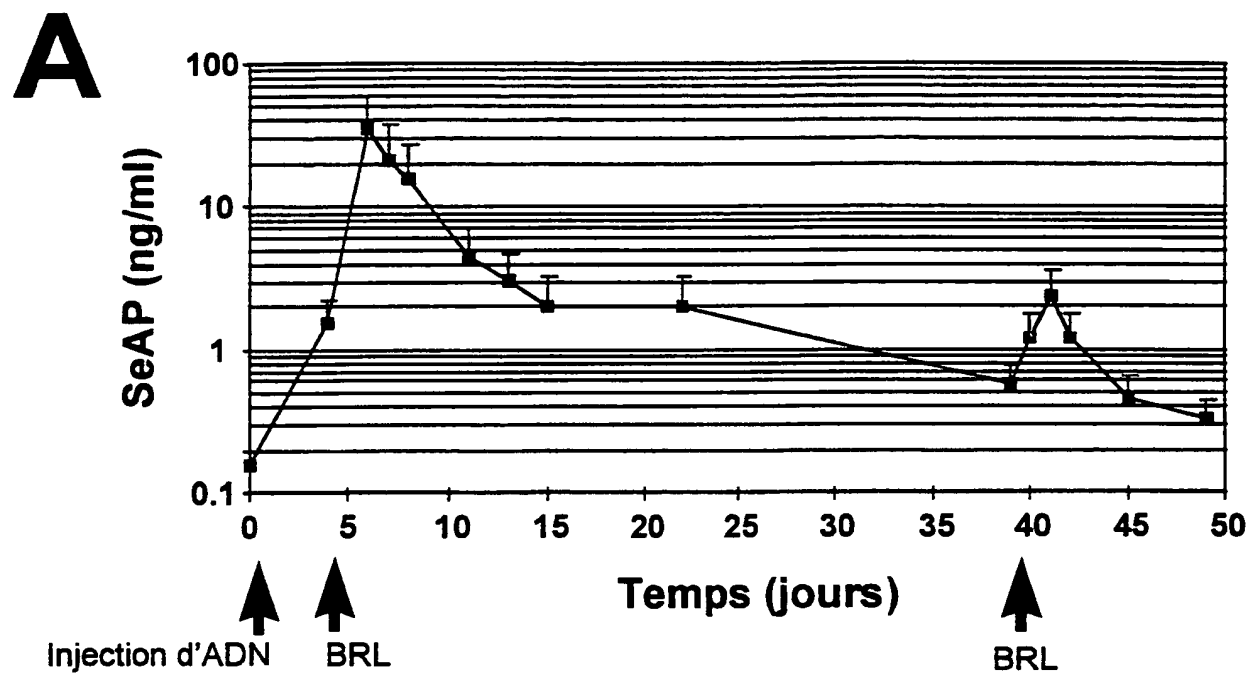


FIGURE 25

26/27

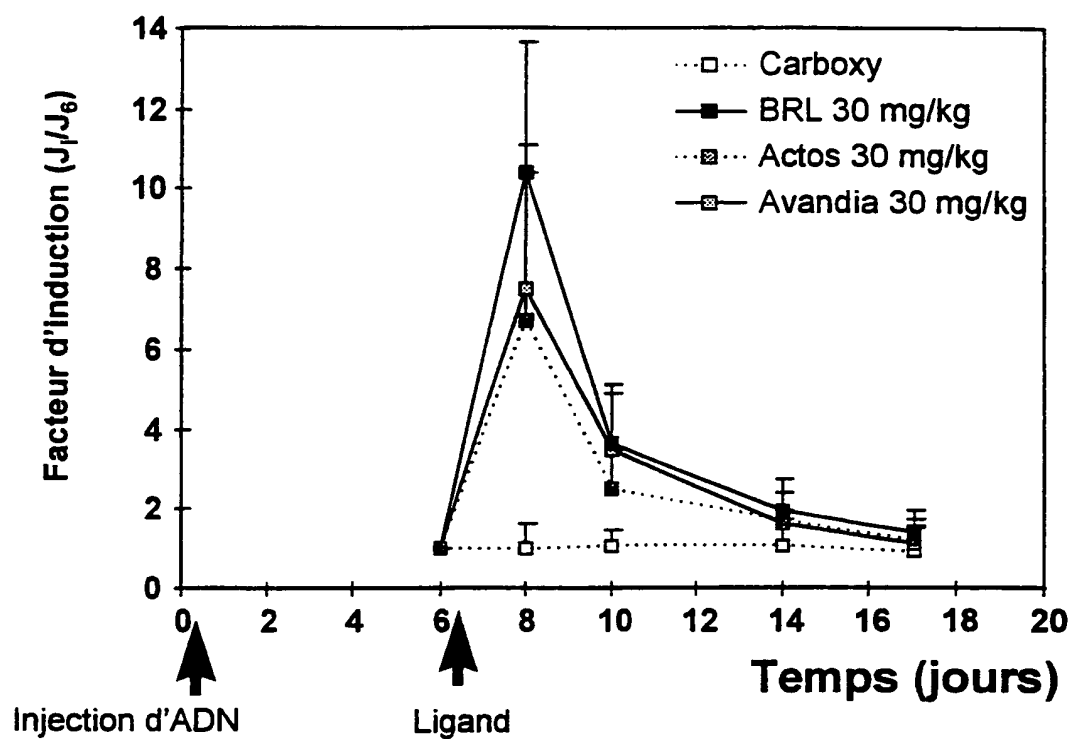
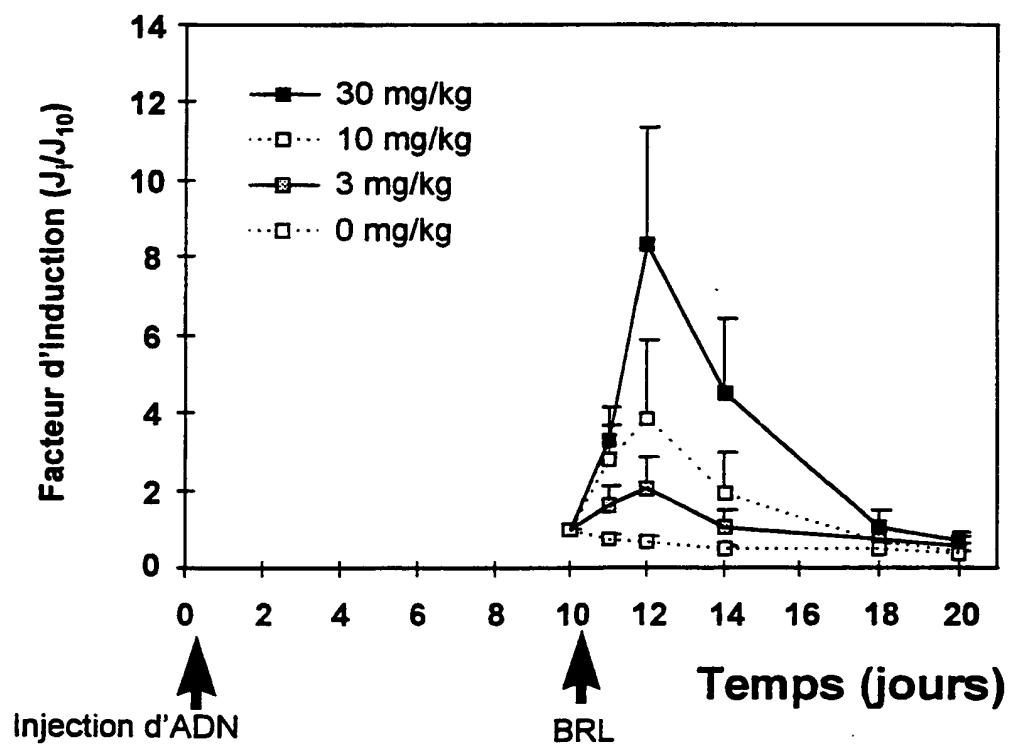
A**B**

FIGURE 26

27/27

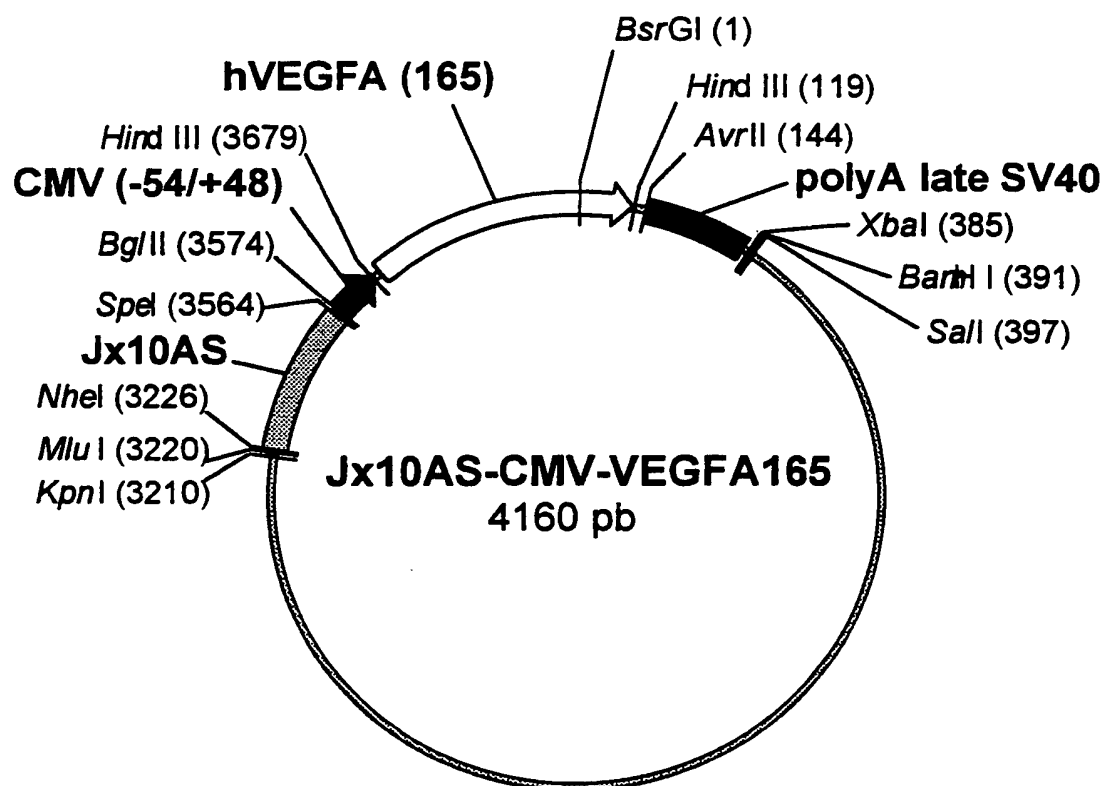


FIGURE 27

LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA S.A.

<120> Système de régulation pharmacologique de l'expression
utilisant les récepteurs nucléaires PPAR et leurs
ligands.

<130> SEQUENCES

<140>

<141>

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 19

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

tcaacccttta ccctggtag

19

<210> 2

<211> 27

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

tcgccaaagct tctcgtgatc tgcggca

27

<210> 3

<211> 37

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

acgtgtcgac actagtggtc agaggatctc taccagg

37

<210> 4

<211> 48

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 4

cgatggtacc ctcgagcaat gtgctagcga gatacttcaa cctttacc

48

<210> 5
<211> 13
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
agggtcaaagg tca 13

<210> 6
<211> 69
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
acgtgtcgac actagtcaaa actagggtcaa aggtcacgga aaactagggtc aaagggtcacg 60
gaaaactag 69

<210> 7
<211> 64
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
cgatggtacc ctcgagcaat gtgctagccg tgacctttga cctagttttc cgtgaccttt 60
gacc 64

<210> 8
<211> 32
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
acgtagatct cggtaggcgt gtacggtggg ag 32

<210> 9
<211> 29
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
acgtaagctt ctatggaggt caaaacagc 29

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10

ggtttgctga atgtgaagcc c 21

<210> 11

<211> 42

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 11

agtctctaga gctacgcgta caagtccttg tagatctcct gc 42

<210> 12

<211> 32

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

agtcacgcgt gggcgatctt gacaggaaag ac 32

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 13

gcctttgagt gagctgatac c 21

<210> 14

<211> 35

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 14

agtcactagt aagctttttg ccgccagaac acagg 35

<210> 15

<211> 36

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

agtcactagt ccatggctgc ccagtgcctc acgacc 36

<210> 16

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

caggtttgct gaatgtgaag c 21

<210> 17
<211> 40
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
tgacgtgtcg acctagtaca agtccttgta gatctcctgc 40

<210> 18
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 18
agtcgtcgac gcttcgagca gacatgataa g 31

<210> 19
<211> 35
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
agtcgctagc gacggatcct tatcgatttt accac 35

<210> 20
<211> 50
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 20
gtcagctagc ctactcgagc caccatgggt gaaactctgg gagattctcc 50

<210> 21
<211> 42
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
tacgggggtac ccagacatga taagatacat tgatgagttt gg 42

<210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 22
gtcagctagc cggtaggcgt gtacggtggg agg 33

<210> 23
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 tacgctcgag cttctatgga ggtcaaaaca gcg

33

<210> 24
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Met Gly Glu Thr Leu Gly Asp Ser Pro Ile Asp Pro Glu Ser Asp Ser
 1 5 10 15
 Phe Thr Asp Thr Leu Ser Ala Asn Ile Ser Gln Glu Met Thr Met Val
 20 25 30
 Asp Thr Glu Met Pro Phe Trp Pro Thr Asn Phe Gly Ile Ser Ser Val
 35 40 45
 Asp Leu Ser Val Met Glu Asp His Ser His Ser Phe Asp Ile Lys Pro
 50 55 60
 Phe Thr Thr Val Asp Phe Ser Ser Ile Ser Thr Pro His Tyr Glu Asp
 65 70 75 80
 Ile Pro Phe Thr Arg Thr Asp Pro Val Val Ala Asp Tyr Lys Tyr Asp
 85 90 95
 Leu Lys Leu Gln Glu Tyr Gln Ser Ala Ile Lys Val Glu Pro Ala Ser
 100 105 110
 Pro Pro Tyr Tyr Ser Glu Lys Thr Gln Leu Tyr Asn Lys Pro His Glu
 115 120 125
 Glu Pro Ser Asn Ser Leu Met Ala Ile Glu Cys Arg Val Cys Gly Asp
 130 135 140
 Lys Ala Ser Gly Phe His Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys
 145 150 155 160
 Gly Phe Phe Arg Arg Thr Ile Arg Leu Lys Leu Ile Tyr Asp Arg Cys
 165 170 175
 Asp Leu Asn Cys Arg Ile His Lys Lys Ser Arg Asn Lys Cys Gln Tyr
 180 185 190
 Cys Arg Phe Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Ser His Asn Ala Ile
 195 200 205

Arg Phe Gly Arg Met Pro Gln Ala Glu Lys Glu Lys Leu Leu Ala Glu
 210 215 220
 Ile Ser Ser Asp Ile Asp Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg
 225 230 235 240
 Ala Leu Ala Lys His Leu Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu
 245 250 255
 Thr Lys Ala Lys Ala Arg Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys
 260 265 270
 Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp
 275 280 285
 Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu
 290 295 300
 Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala
 305 310 315 320
 Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn
 325 330 335
 Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu
 340 345 350
 Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu
 355 360 365
 Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu
 370 375 380
 Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val
 385 390 395 400
 Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile
 405 410 415
 Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys
 420 425 430
 Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln
 435 440 445
 Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu
 450 455 460
 Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu
 465 470 475 480
 Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu
 485 490 495
 Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr Ala Trp Ala Ile Leu Thr Gly

500	505	510
Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr Asp Met Asn Ser Leu		
515	520	525
Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln		
530	535	540
Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe		
545	550	555
Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile		
565	570	575
Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys		
580	585	590
Tyr Gly Val His Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn		
595	600	605
Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu		
610	615	620
Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys		
625	630	635
Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp		
645	650	655
Leu Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly		
660	665	670
Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln		
675	680	685
Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu		
690	695	700
Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr		
705	710	715
Glu His Val Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met		
725	730	735
Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr		
740	745	750

<210> 25

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

8

Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His Ile Thr Pro Leu Gln
 1 5 10 15
 Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile Arg Ile Phe Gln Gly Cys Gln Phe
 20 25 30
 Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu Tyr Ala Lys Ser Ile
 35 40 45
 Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys
 50 55 60
 Tyr Gly Val His Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu Ala Ser Leu Met Asn
 65 70 75 80
 Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser Glu Gly Gln Gly Phe Met Thr Arg Glu
 85 90 95
 Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp Phe Met Glu Pro Lys
 100 105 110
 Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu Leu Asp Asp Ser Asp
 115 120 125
 Leu Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser Gly Asp Arg Pro Gly
 130 135 140
 Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln Asp Asn Leu Leu Gln
 145 150 155 160
 Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro Glu Ser Ser Gln Leu
 165 170 175
 Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu Arg Gln Ile Val Thr
 180 185 190
 Glu His Val Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys Thr Glu Thr Asp Met
 195 200 205
 Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys Asp Leu Tyr Ala Trp
 210 215 220
 Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr
 225 230 235 240
 Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His
 245 250 255
 Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile Arg Ile Phe
 260 265 270
 Gln Gly Cys Gln Phe Arg Ser Val Glu Ala Val Gln Glu Ile Thr Glu
 275 280 285
 Tyr Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Val Asn Leu Asp Leu Asn Asp Gln

290	295	300
Val Thr Leu Leu Lys Tyr Gly Val His Glu Ile Ile Tyr Thr Met Leu		
305	310	315 320
Ala Ser Leu Met Asn Lys Asp Gly Val Leu Ile Ser Glu Gly Gln Gly		
	325	330 335
Phe Met Thr Arg Glu Phe Leu Lys Ser Leu Arg Lys Pro Phe Gly Asp		
	340	345 350
Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu		
	355	360 365
Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser		
	370	375 380
Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln		
	385	390 395 400
Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro		
	405	410 415
Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu		
	420	425 430
Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys		
	435	440 445
Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys		
	450	455 460
Asp Leu Tyr		
465		

<210> 26
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 cccgttacat aacttacggt aaatggcccg

30

<210> 27
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gggacgcgct tctacaaggc gctggccgaa

30

10

<210> 28

<211> 30

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 28

cgactctaga agatcttgcc ccgcccagcg

30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 00/01744

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/85 A61K48/00 C07K14/705 C12N5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BARDOT, O. ET AL.: "PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 192, no. 1, 1993, pages 37-45, XP000907578 ORLANDO, FL US	1-3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	figure 1 ----- -/-	1-27,30



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 November 2000

Date of mailing of the international search report

01/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

PCT/FR 00/01744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VU-DAC N, SCHOONJANS K, LAINE B, FRUCHART JC, AUWERX J, STAELS B: "Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element." J BIOL CHEM 1994 DEC 9;269(49):31012-8, XP002139315	1-3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	page 31015, column 1, paragraph 2 -page 31016, column 1, paragraph 3; figure 1	1-27,30
X	VU-DAC N, SCHOONJANS K, KOSYKH V, DALLONGEVILLE J, FRUCHART JC, STAELS B, AUWERX J.: "Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor." J CLIN INVEST. 1995 AUG;96(2):741-50., XP000913668	1,3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	the whole document	1-27,30
X	SCHOONJANS K, ET AL.: "Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter." J BIOL CHEM. 1995 AUG 18;270(33):19269-76., XP000907443	1-3,5,6, 14,22, 24,25, 27,30
Y	the whole document	1-27,30
X	FROHNERT BI, HUI TY, BERNLOHR DA.: "Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene." J BIOL CHEM. 1 12;274(7):3970-7., February 1999 (1999-02), XP000907447 page 3973; figures 2,4A; table 1	1-3,5,6, 8,14,22, 24,25,27
X	MUKHERJEE ET AL: "RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo." ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL., vol. 18, no. 2, February 1998 (1998-02), XP000913726	1-3,5,6, 10,14, 16,22, 24,25, 27,30
Y	the whole document	1-27,30
Y	WO 98 21349 A (STAELS BART ;MAHFOUDI ABDERRAHIM (FR); AUWERX JOHAN (FR); BENOIT P) 22 May 1998 (1998-05-22) cited in the application the whole document	1-27

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No
PCT/FR 00/01744

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 96 01317 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 18 January 1996 (1996-01-18)</p> <p>page 16, line 19 -page 17, line 18; claims 1-15,18,23,25,29,33; figure 2</p> <p>page 20, line 15 -page 22, line 21</p> <p>-----</p>	<p>1-3,5,6, 14,22, 24-30</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/01744

Pat nt document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9821349 A	22-05-1998	FR 2755699 A	15-05-1998
		AU 5057898 A	03-06-1998
		BR 9713981 A	02-05-2000
		CZ 9901633 A	11-08-1999
		EP 0946740 A	06-10-1999
		HU 9904235 A	28-04-2000
		NO 992153 A	04-05-1999
		SK 61499 A	14-02-2000
WO 9601317 A	18-01-1996	AU 2952695 A	25-01-1996
		CA 2194169 A	18-01-1996
		EP 0769052 A	23-04-1997
		JP 10502256 T	03-03-1998
		US 5861274 A	19-01-1999

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01744

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/85 A61K48/00 C07K14/705 C12N5/10		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C12N C07K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BARDOT, O. ET AL.: "PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 192, no. 1, 1993, pages 37-45, XP000907578 ORLANDO, FL US figure 1	1-3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	--- -/--	1-27,30
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">27 novembre 2000</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">01/12/2000</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Chambonnet, F</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

mandat internationale No

PCT/FR 00/01744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	VU-DAC N, SCHOONJANS K, LAINE B, FRUCHART JC, AUWERX J, STAELS B: "Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element." J BIOL CHEM 1994 DEC 9;269(49):31012-8, XP002139315	1-3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	page 31015, colonne 1, alinéa 2 -page 31016, colonne 1, alinéa 3; figure 1	1-27,30
X	VU-DAC N, SCHOONJANS K, KOSYKH V, DALLONGEVILLE J, FRUCHART JC, STAELS B, AUWERX J.: "Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor." J CLIN INVEST. 1995 AUG;96(2):741-50., XP000913668	1,3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	le document en entier	1-27,30
X	SCHOONJANS K, ET AL.: "Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter." J BIOL CHEM. 1995 AUG 18;270(33):19269-76., XP000907443	1-3,5,6, 14,22, 24,25, 27,30
Y	le document en entier	1-27,30
X	FROHNERT BI, HUI TY, BERNLOHR DA.: "Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene." J BIOL CHEM. 1 12;274(7):3970-7., février 1999 (1999-02), XP000907447 page 3973; figures 2,4A; tableau 1	1-3,5,6, 8,14,22, 24,25,27
X	MUKHERJEE ET AL: "RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo." ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL., vol. 18, no. 2, février 1998 (1998-02), XP000913726	1-3,5,6, 10,14, 16,22, 24,25, 27,30
Y	le document en entier	1-27,30
Y	WO 98 21349 A (STAELS BART ;MAHFOUDI ABDERRAHIM (FR); AUWERX JOHAN (FR); BENOIT P) 22 mai 1998 (1998-05-22) cité dans la demande le document en entier	1-27

-/--

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 00/01744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 96 01317 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 18 janvier 1996 (1996-01-18)</p> <p>page 16, ligne 19 -page 17, ligne 18; revendications 1-15,18,23,25,29,33; figure 2</p> <p>page 20, ligne 15 -page 22, ligne 21</p>	<p>1-3,5,6, 14,22, 24-30</p>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Formulaire internationale No

PCT/FR 00/01744

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9821349 A	22-05-1998	FR 2755699 A	15-05-1998
		AU 5057898 A	03-06-1998
		BR 9713981 A	02-05-2000
		CZ 9901633 A	11-08-1999
		EP 0946740 A	06-10-1999
		HU 9904235 A	28-04-2000
		NO 992153 A	04-05-1999
		SK 61499 A	14-02-2000
WO 9601317 A	18-01-1996	AU 2952695 A	25-01-1996
		CA 2194169 A	18-01-1996
		EP 0769052 A	23-04-1997
		JP 10502256 T	03-03-1998
		US 5861274 A	19-01-1999

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREV
PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire ST99021	POUR SUITE voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après A DONNER	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 01744	Date du dépôt international(jour/mois/année) 22/06/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 22/06/1999
Déposant AVENTIS PHARMA S.A.		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 6 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☒ Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (voir le cadre I).

3. ☐ Il y a absence d'unité de l'invention (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☐ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☒ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

SYSTEME DE REGULATION DE L'EXPRESSION UTILISANT LES RECEPTEURS NUCLEAIRES PPAR

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☒ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

20

☐ Aucune des figures n'est à publier.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 17

La formulation de la revendication 17 " vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b) selon la revendication" est évidemment incomplète et devrait vraisemblablement être corrigée en : " vecteur comprenant un élément (a) et un élément (b) selon la revendication 1" qui correspond à la revendication complète dans le document de priorité. La recherche a été faite en se basant sur cette correction.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/00/01744

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 7 C12N15/85 A61K48/00 C07K14/705 C12N5/10

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, STRAND, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	BARDOT, O. ET AL.: "PPAR-RXR heterodimer activates a peroxisome proliferator response element upstream of the bifunctional enzyme" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol. 192, no. 1, 1993, pages 37-45, XP000907578 ORLANDO, FL US	1-3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	figure 1 ----- -/--	1-27,30



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 novembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

01/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/00/01744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	VU-DAC N, SCHOONJANS K, LAINE B, FRUCHART JC, AUWERX J, STAELS B: "Negative regulation of the human apolipoprotein A-I promoter by fibrates can be attenuated by the interaction of the peroxisome proliferator-activated receptor with its response element." J BIOL CHEM 1994 DEC 9;269(49):31012-8, XP002139315	1-3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	page 31015, colonne 1, alinéa 2 -page 31016, colonne 1, alinéa 3; figure 1 ---	1-27,30
X	VU-DAC N, SCHOONJANS K, KOSYKH V, DALLONGEVILLE J, FRUCHART JC, STAELS B, AUWERX J.: "Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor." J CLIN INVEST. 1995 AUG;96(2):741-50., XP000913668	1,3,5,6, 10,14, 22,24, 25,27,30
Y	le document en entier ---	1-27,30
X	SCHOONJANS K, ET AL.: "Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter." J BIOL CHEM. 1995 AUG 18;270(33):19269-76., XP000907443	1-3,5,6, 14,22, 24,25, 27,30
Y	le document en entier ---	1-27,30
X	FROHNERT BI, HUI TY, BERNLOHR DA.: "Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene." J BIOL CHEM. 1 12;274(7):3970-7., février 1999 (1999-02), XP000907447 page 3973; figures 2,4A; tableau 1 ---	1-3,5,6, 8,14,22, 24,25,27
X	MUKHERJEE ET AL: "RXR agonists activate PPARalpha-inducible genes, lower triglycerides, and raise HDL levels in vivo." ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL., vol. 18, no. 2, février 1998 (1998-02), XP000913726	1-3,5,6, 10,14, 16,22, 24,25, 27,30
Y	le document en entier ---	1-27,30
Y	WO 98 21349 A (STAELS BART ;MAHFOUDI ABDERRAHIM (FR); AUWERX JOHAN (FR); BENOIT P) 22 mai 1998 (1998-05-22) cité dans la demande le document en entier ---	1-27
	-/--	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/00/01744

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WO 96 01317 A (SALK INST FOR BIOLOGICAL STUDI) 18 janvier 1996 (1996-01-18)</p> <p>page 16, ligne 19 -page 17, ligne 18; revendications 1-15,18,23,25,29,33; figure 2 page 20, ligne 15 -page 22, ligne 21 -----</p>	<p>1-3,5,6, 14,22, 24-30</p>

